

TARTU ÜLIKOOL
LOODUS- JA TÄPPISTEADUSTE VALDKOND
MOLEKULAAR- JA RAKUBIOLOOGIA INSTITUUT
MEDITSIINITEADUSTE VALDKOND
BIO- JA SIIRDEMEDITSIINI INSTITUUT
MIKROBIOLOOGIA OSAKOND

Mutans-streptokokkide virulentsusfaktorid

Magistritöö

Biomeditsiin

30 EAP

Greete Maasi

Juhendajad Prof. Reet Mändar

PhD Jelena Štšepetova

PhD Merike Jõesaar

Tartu 2020

Mutans-streptokokkide virulentsusfaktorid

Mutans-streptokokid on bakteritegrupp, kuhu kuuluvad *Streptococcus mutans* ja *Streptococcus sobrinus*, mis koloniseerides hambapinda võivad tekitada hambakaariest. Kuna suus ja hambakaariese koldes on keskkonnatingimused keerulised ja pidevalt muutuvad, peavad mutans-streptokokid neid taluma ja pidevalt kohanema. Neil on kujunenud aja jooksul teatud eelised – virulentsusfaktorid. Mutans-streptokokkidel on virulentsuses olulised tüvede vahelised erinevused. Uurides virulentsust tekitavaid geene ning võrreldes neid stomatoloogilise informatsiooniga, saab hinnata võimalikke erinevusi kahe liigi kariogeensuses ning selgitada välja geenid, mis on virulentsuse aluseks.

Märksõnad: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, virulentsusfaktor, geen, kariogeensus, hambakaaries

CERCS: B230 Mikrobioloogia, bakterioloogia, viroloogia, mükoloogia

Virulence factors of Mutans streptococci

Mutans-streptococci are a group of bacteria that includes *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*, which can cause tooth decay by colonizing the tooth surface. Mutans-streptococci must tolerate and continuously adapt to complex and constantly changing environmental conditions in mouth and in dental plaque. They have developed certain advantages – virulence factors. There are differences in virulence factors between the different strains of Mutans-streptococci. By studying the virulence genes and comparing them with stomatological information, it is possible to assess potential differences in the cariogenicity of the two species and to identify the genes that underlie the virulence.

Keywords: *Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*, virulence factors, genes, cariogenicity, dental caries

CERCS: B230 Microbiology, bacteriology, virology, mycology

Sisukord

Kasutatud lühendid	5
Sissejuhatus	6
1 Kirjanduse ülevaade	7
1.1 Hambakaaries.....	7
1.1.1 Mõiste ja klassifikatsioon	7
1.1.2 Levimus	8
1.1.3 Etiopatogeneetilised tegurid	9
1.1.4 Ravi ja profülaktika	11
1.2 Mutans-streptokokid	13
1.2.1 Liigid ja nende levimus elanikkonnas	14
1.2.2 Virulentsusfaktorid ja nende geenid	15
1.2.2.1 Kinnitumine hambaemailile (adhesioon)	16
1.2.2.2 Biokile moodustamine.....	18
1.2.2.3 Eksopolüsahhariidi ehk EPS tootmine	19
1.2.2.4 Orgaaniliste hapete tootmine süsivesikutest	21
1.2.2.5 Vastupidavus happelises keskkonnas.....	22
2 Uurimus	24
2.1 Töö eesmärgid.....	24
2.2 Materjal ja metoodika	24
2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja tüvede identifitseerimine	24
2.2.2 Doonorite kliinilised andmed	25
2.2.3 DNA eraldamine.....	25
2.2.4 PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon	25
2.2.5 Praimerite temperatuuri optimeerimine.....	27
2.2.6 Gelelektroforees.....	27
2.2.7 Genotüpiseerimine.....	27

2.2.8	Statistiline analüüs.....	28
2.3	Tulemused ja arutelu.....	29
2.3.1	Doonorite kliinilised andmed	29
2.3.2	Tüvede genotüpiseerimine.....	30
2.3.3	Virulentsusega seotud geenide esinemine mutans-steptokokkidel.....	31
2.3.4	Virulentsusega seotud geenide esinemine emadel ja lastel	37
2.3.5	Seos kliiniliste parameetrite ja geenide vahel.....	38
	Kokkuvõte	42
	Summary.....	44
	Tänu sõnad.....	46
	Kasutatud kirjandus	47
	LISA 1.	57
	LISA 2.	59
	LISA 3.	61
	Lihtlitsents	62

Kasutatud lühendid

CFU – pesa moodustav ühik (*colony forming unit*)

dmf – lagunenu/puudu/täidetud piimahambad (*decayed/missing/filled*)

DMFT – lagunenu/puudu/täidetud jäävhambad (*decayed/missing/filled teeth*)

DMFS – lagunenu/puudu/täidetud jäävhambapinnad (*decayed/missing/filled surfaces*)

EPS – eksopolüsahhariid

FTF – fruktosüültransferaas

Gbps – glükaani siduvad valgud

GTF – glükosüültransferaas

HK – histidiin-kinaas

HUMB – Inimese Mikrobioota Biopank

MS – mutans-streptokokid (*Mutans streptococci*)

PTS – fosfotransferaassüsteem

RR – vastuseregulaator (*response regulator*)

SAG – süljeaglutiniin

SM – *Strip mutans*

TCS – kahekomponendiline süsteem (*two-component system*)

WHO – Maailma Terviseorganisatsioon

Sissejuhatus

Hambakaaries on ebameeldivaid komplikatsioone tekitav haigus, mis on tänapäeval väga levinud. Hambakaarieste tekitajatenä on teada mutans-streptokokid – *Streptococcus mutans* ja *Streptococcus sobrinus*. Kuigi kaariest ning selle põhjustajaid on uuritud palju ning erinevate suunitlustega, ei leidu uurimusi, kus oleks võrreldud suuremal hulgal mõlema kaariesetekiata virulentsusfaktoreid stomatoloogiliste näitajatega. Sellest tingituna seati uurimistöo eesmärgiks selgitada välja kaariest tekitavate mutans-streptokokkide virulentsusfaktorid ja võrrelda saadud geneetilist infot kirjanduse andmetega ning eelnevalt kogutud patsientide kliiniliste andmetega.

Eesmärgi täitmiseks uuriti käesolevas töös Jana Olaki doktoritöö raames kogutud *S. mutans*'i ja *S. sobrinus*'e tüvede virulentsust tekitavaid geene ning saadud andmeid võrreldi inimeste suutervise markeritega.

Rahvatervise seisukohalt on antud uurimistöo väga oluline, sest projekti lõppeesmärgiks on välja töötada vaktsiinid hambakaariest põhjustavate mikroobide vastu, mille tulemusena väheneksid kulutused tervishoiule ning paraneks inimeste elukvaliteet.

Uurimistöo eesmärkideks on:

1. Selgitada välja kaariest tekitavate mutans-streptokokkide (*S. mutans*, *S. sobrinus*) virulentsusfaktorid.
2. Võrrelda saadud geneetilist infot kirjanduse andmetega ning eelnevalt kogutud patsientide kliiniliste andmetega.

Käesolev magistritöö on kirjutatud Tartu Ülikooli biomeditsiini õppekava raames. Töös tehtud katsed teostati Tartu Ülikooli meditsiiniteaduste valdkonnas, bio- ja siirdemeditsiini instituudis, mikrobioloogia osakonnas.

1 Kirjanduse ülevaade

1.1 Hambakaaries

1.1.1 Mõiste ja klassifikatsioon

Suu on sünnist alates koloniseeritud paljude erinevate mikroorganismide poolt (Avila *et al.*, 2009; Pitts *et al.*, 2017), milleks on enamjaolt bakterid, aga võib leiduda ka viiruseid, seeni, algloomi ja arhesid (Loesche, 1986). Suu mikrobioota ja peremehe vahel on enamikel juhtudel sümbiontne või mutualistlik suhe, kuid tasakaalu nihkudes võivad tekkida patoloogilised protsessid.

Hambakaaries on bakteriaalne haigus, mis on seotud mikrobioloogiliste nihetega, mida mõjutavad nii suuhügieen, seal hulgas kokkupuude fluoriidiga, toitumine, süljevool ning selle koostis, kui ka geneetilised tegurid. Haigus võib tekkida kogu elu vältel, imikueast kuni kõrge vanuseni ning resideeruda nii piima- kui jäävhammastel (Pitts *et al.*, 2017; Selwitz *et al.*, 2007). Kaaries võib olla pöörduv ning süveneb üldjuhul aeglaselt, kuid siiski järjepidevalt hambaid kahjustades (Featherstone, 2004; Fejerskov & Manji, 1990; Pitts, 2004; Selwitz *et al.*, 2007).

Hamba pinnal olev bakteriaalne biokile koos toidujäätmega moodustab hambakatu. Kaariese kahjustused tekivad, kui hambapinnal arenevat hambakattu ei eemaldata õigeaegselt (Pitts, 2004; Pitts *et al.*, 2017). Kui katt püsib hambal pikka aega, muutub keskkond happeliseks. Kui hamba pinna pH on $< 5,5$, siis on demineralisatsioon kiirem kui remineralisatsioon. Hambaemail hakkab hävinema ning tagajärjeks on hambaaugud (Selwitz *et al.*, 2007). Hambaauk on juba kaugele arenenud haigusprotsessi tagajärg (Featherstone, 2004; Selwitz *et al.*, 2007). Esimesed hambakaariese märgid on hambaemailile tekkivad valged laigud. Need laikkahjustused on hambakatu all olevad demineraliseerumisalad (Kidd & Fejerskov, 2004; Selwitz *et al.*, 2007). De- ja remineraliseerumise vahelisest tasakaalust sõltub, kas juba tekkinud hambakaaries progresseerub, peatub või pöördub (Featherstone, 2004; Pitts, 2004; Selwitz *et al.*, 2007). Kui ülekaalus on demineraliseerumine, võib see viia hambakaariese tekkele. Õnneks on remineraliseerumine sagedane, kuna sülj suudab biokile pH normaliseerida, käitudes puhvrina. Lisaks on remineraliseeritud aladel kõrgem fluoriiditase (Selwitz *et al.*, 2007).

Kaariest saab klassifitseerida erinevate kriteeriumide järgi – asukoha, etioloogia, progresseerumise astme ning kaariesest mõjutatud kudede järgi (Young *et al.*, 2015). Seetõttu on ka teaduskirjanduses kasutatud mitmeid erinevaid klassifikatsioone ning tulemusi on sellest tingituna keeruline võrrelda. Praktistel kaalutlustel rakendatakse hambakaariese hindamisel sageli DMF (*decayed/missing/filled*) indekseid, kuna seda on tehniliselt lihtne teostada, kasutades vaid vatitampoone, sondi ja peeglit (Broadbent & Thomson, 2005). See on WHO loodud diagnostikakriteerium arvuliseks kaariese väljendamiseks (World Health Organization, 1997), mis kirjeldab hambakaariese levimust indiviidil. Kaariese indeks arvutatakse D (*decayed* – lagunenu), M (*missing* – puudu) ja F (*filled* – täidetud) kaariesekahjustusega hammaste (T – *teeth*) või hambapindade (S – *surfaces*) järgi. DMFT (*decayed/missing/filled teeth*) indeks võib olla vahemikus 0 kuni 28 või 32 (kui on olemas tarkusehambad) ning DMFS (*decayed/missing/filled surfaces*) indeks 0 kuni 128. Laste puhul kasutatakse dmf indeksit, millel on sama põhimõte, kuid arvutatakse piimahammaste järgi ning indeks võib varieeruda vahemikus 0 kuni 20 (Cappelli & Mobley, 2008).

1.1.2 Levimus

Hambakaaries on levinud haigus nii täiskasvanute kui laste seas (Forssten *et al.*, 2010; Lee, 2013; Loesche, 1986; Pitts *et al.*, 2017) ning on inimestel ebaühtlaselt jaotunud (Selwitz *et al.*, 2007). Maailma elanikkonnast on haigestunud umbes 70–80%, laste seas esineb kaariest 60–90%. Haigus on levinud pigem arenenud riikides, nagu USA ja Euroopa. Aafrika riikides on hambakaariese indeks madalam, mis võib tuleneda söömisharjumustest ja fluoriidisisaldusest joogivees (Petersen *et al.*, 2005). LISAdes 1A ja 1B on esitatud ülemaailmse hambakaariese levimuse kaardid nii laste kui ka täiskasvanute kohta.

Ka Euroopa siseselt hambakaariese levimus varieerub, näiteks Soomes on täheldatud 2 kuni 3 aasta vanustest lastest kaariest 8% (Karjalainen *et al.*, 2001), Poolas seevastu 56% (Szatko *et al.*, 2004). Eestis läbi viidud uuringus leiti, et 3-aastastel lastel esines kaariest 29%, 6-aastastel lastel 72% ning 12-aastastel 68% (Olak *et al.*, 2019).

Kaaries on suuresti seotud inimese eluviisidega ning riskifaktoriteks on halvad toitumisharjumused, nagu sagedane süsivesikute tarbimine ja ebapiisav suuhügieen, mis võib omakorda olla tingitud indiviidi majanduslikust tasemest, sotsiaalsest staatusest, haridusest, vanusest või hambaravi kättesaadavusest (Krol, 2003). Arenenud riikides on täheldatud hambakaariese levimuse ja raskusastme langust (Brown & Selwitz, 1995; Selwitz *et al.*,

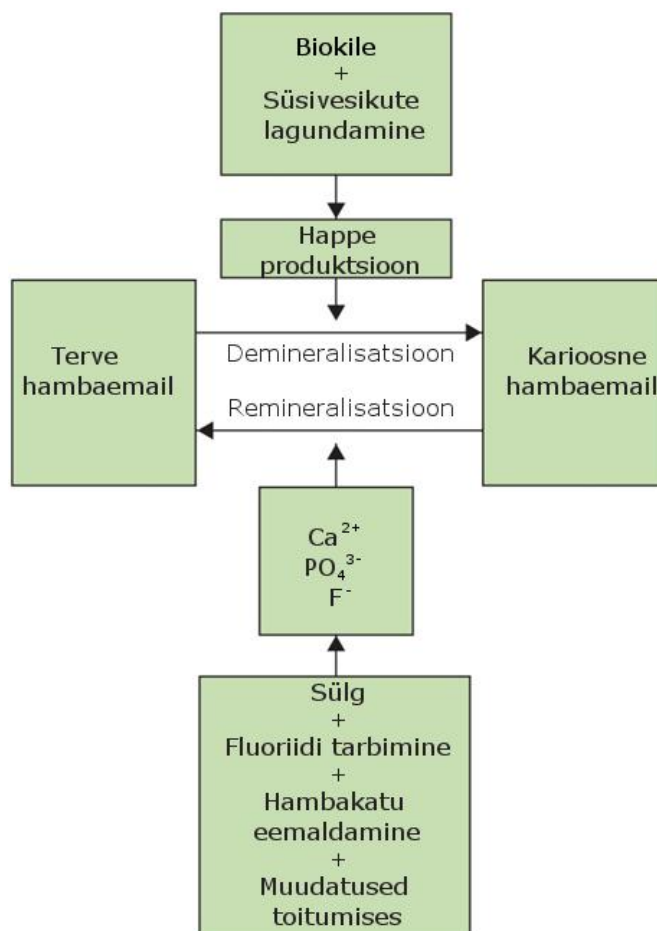
2007), kuid diagnostiliste kriteeriumide erinevused erinevates uuringutes muudavad võrdluse, jaotuse ja sageduse määramise keeruliseks (Ismail, 2004). Samas vanurite seas näitab hambakaariese esinemine tõusu, kuna inimestel säilib suus rohkem hambaid (Anderson, 2002).

Kuna hambakaaries on nakkushaigus, suureneb lapsel haigestumise risk, kui tema hooldajal, tavaliselt emal või õdedel-vendadel, esineb suus rohkesti hambakaariest tekitavaid mikroorganisme (Douglass *et al.*, 2008; Krol, 2003; Lee, 2013). Oluline on informeerida lapsevanemaid hambakaariesest, selle levikust ning takistamise võimalustest. Raseduse ning imetamise ajal on samuti oluline hoida suuhügieeni, et takistada nakkuse levikut lapsele, mille tulemusel võib tekkida hiljem varajane lapsepõlve kaaries. Lisaks tuleb üle vaadata lapse toitmisharjumused, sest näiteks imikute lutipudeliga toitmisel piimaseguga suureneb mutansstreptokokkide hulk suu mikrobiotas (Marsh, 2010). Piima- ja jäävhammastel on anatoomilised erinevused emaili kihis ning seetõttu on kaariese tekkeoht suurem just lastel (Pitts *et al.*, 2017).

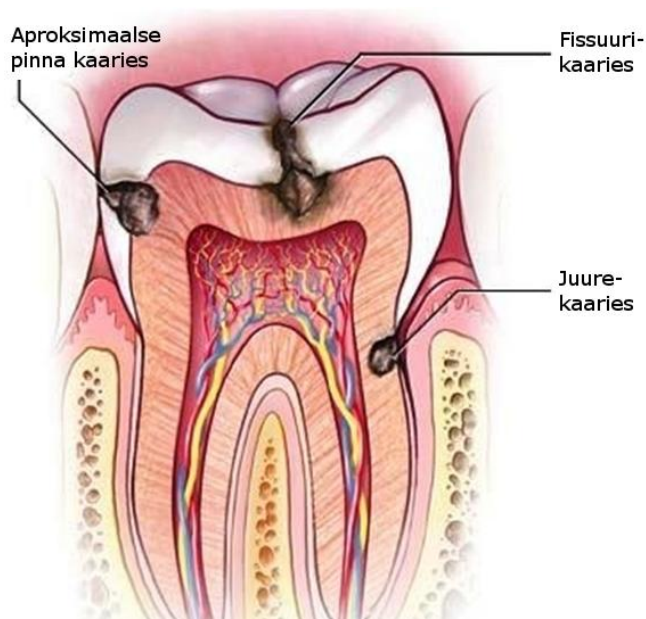
1.1.3 Etiopatogeneetilised tegurid

Hambakaaries on multifaktoriaalse etioloogiaga haigus, mis on seotud inimese elustiili ja käitumisega, keskkonna faktoritega (Fejerskov & Manji, 1990; Selwitz *et al.*, 2007) kui ka patogeenidega nagu mutansstreptokokid (MS) ja mõned teised piimhappebakterid, sh mõned *Lactobacillus* spp liigid (Burne, 1998; Loesche, 1986). MS grupi liikidest esinevad inimesel *Streptococcus mutans* ja *Streptococcus sobrinus*. MSil on omadus moodustada biokilet. Biokile on mingile pinnale kinnitunud bakterite kogum, mis on enamasti kaetud eksopolüsahhariididest koosneva maatriksiga (Costerton, 1999). Biokilele võivad kinnituda ka teised bakterid, mis omakorda toodavad erinevaid metaboliite, eelkõige süsivesikute lagundamisel tekkivaid orgaanilisi happeid. Nii moodustub hambakatt. Keskkond hambakatus muutub happeliseks, tagajärjeks on hambaemaili ja hiljem ka dentiini demineraliseerumine (Featherstone, 2004; Lee, 2013; Pitts *et al.*, 2017; Selwitz *et al.*, 2007). Kaariesebakterid ise taluvad hapet. Suhkru tarbimise tihedus ja kogus mõjutavad hambakaariese esinemissagedust (Lee, 2013; Sheiham & James, 2014). Joonisel 1 on toodud protsessid ja nende tasakaal, mis on olulised hambakaariese tekkel. Loesche uurimusest (Loesche, 1986) on leitud, et *S. mutans* ja *S. sobrinus* on levinumad hambakaariese varajases staadiumis, seevastu laktobatsille, aktinomütseete ja teisi happebaktereid leitakse pigem kaugelearenenud kaariesekolletest. Bakterikooslused varieeruvad ka erinevatel hambapindadel. Hamba fissuurid (Joonis 2) on

kohad, kuhu hambakaaries kipub kõige sagedamini tekkima. Nendel pindadel on leitud ka kõige tugevam seos kaariese kahjustuse ja MS esinemise vahel (Marsh, 2010).

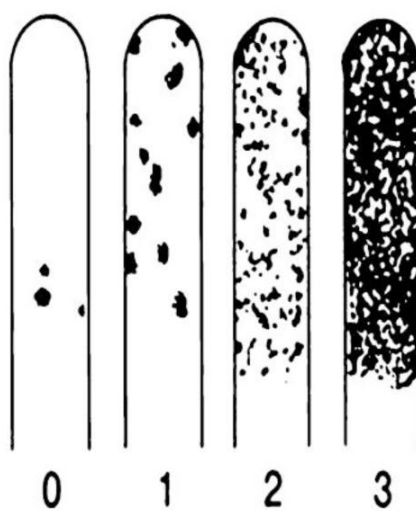


Joonis 1. Kaarieseprotsessi skeem (modifitseeritud Selwitz *et al.*, 2007 järgi).



Joonis 2. Sagedaseimad hambakaariese tekkekohad hambal (modifitseeritud juniordentist.com järgi).

Mutans-streptokoki esinemist suus ja hulka mõõdetakse Jensen'i ja Bratthall'i loodud meetodi, Dentocult® SM Strip mutans abil (Jensen & Bratthall, 1989), mis võimaldab lihtsalt tuvastada MSe süljest ja hambakatust ning aitab kaasa varajase kaariese avastamisele ja ennetamisele. Testriba asetatakse inimesele suhu, et see puutuks kokku sülje ja hambakatuga. Seejärel torgatakse riba selektiivsesse vedelsöötmesse ning riba inkubeeritakse 48 tundi 35–37 °C juures, et MSid hakkaksid kasvama. Kui proovis leidub baktereid, kleepuvad nad testriba karedale pinnale proportsionaalselt nende tihedusega süljes ja hambakatus (Orion Diagnostica). Tulemused tõlgendatakse vastavalt juhendile (Joonis 3).



Joonis 3. Dentocult® SM Strip mutans taseme hindamine (Orion Diagnostica). Strip mutans skoor jagatakse nelja klassi vastavalt testriba peal kasvavate mutans-streptokoki CFU/ml-le (pesa moodustav ühik). Esimene testriba on SM skooriga 0, millel kasvab < 10 000 CFU/ml kohta; teisel on SM skoor 1 ning CFU/ml < 100 000; kolmandal on SM skoor 2 ning CFU/ml 100 000–1 000 000; neljandal on SM skoor 3 ning CFU/ml > 1 000 000.

Haigus võib avalduda juba varajases lapseas ning MS suurt hulka suus peetakse peamiseks riskiteguriks kaariese arengus. Siiski on ainult MS hulga järgi keeruline konkreetsel inimesel hambakaariese arengut ennustada, kuna suu mikrobiota on keerukas ning kaariese protsessi tekkel või ära hoidmisel mängivad rolli paljud tegurid. Üheks oluliseks teguriks peetakse MS erinevate liikide olemasolu ja nende erinevaid virulentsusfaktoreid (Burne, 1998; Hirose *et al.*, 1993; Loesche, 1986; Selwitz *et al.*, 2007).

1.1.4 Ravi ja profülaktika

Hambakaaries ning selle tagajärjed võivad põhjustada inimesel tugevat valu, aga ka põletikuseisundit ja sellest tulenevaid kahjustusi mujal organismis. Samuti on kaariese ravi

kallis ja võib kesta kogu elu, kuna hamba struktuur on hävinud ning vajab järjepidevat ülevaatus ja hoold (Selwitz *et al.*, 2007). Sellest tingituna tuleks hambakaariest pigem ennetada. Kaariese kontrollimiseks peaks kombineerima diagnostikat, patsiendi riskigrupi hindamist, sõeluuringuid ning haigust ennetavat lähenemisviisi (Pitts *et al.*, 2017).

Tänapäeval on levinuimaks kaariese raviviisiks taastav ravi, kuid selline kliinilise praktika meetod ei ole siiski ideaalne, kuna ravi ei hävita haiguskollet ning soodustab seetõttu korduvaid haigestumisi. Üha soovituslikumaks hambakaariese arengu takistamise meetodiks on ennetav lähenemisviis, mille eesmärk on kontrollida haigusprotsessi algust ning kulgu inimese eluea jooksul, säilitada hammaste struktuur, vältida emaili demineraliseerumist ning soodustada paranemist loomulikult teel (Pitts *et al.*, 2017; Selwitz *et al.*, 2007). Varajase karioosse kahjustuse ennetamiseks on oluline hambakatu hoolikas eemaldamine (Selwitz *et al.*, 2007) ja remineraliseerumisvõime parandamine, kuna hambad puutuvad pidevalt kokku hapetega ning remineraliseerumine aitab hammaste terviklikkust säilitada (Pitts *et al.*, 2017). Biokile tekkimise takistamiseks on olulisteks vahenditeks hambahari, fluoriidi sisaldusega hambapasta ning hambaniit (Selwitz *et al.*, 2007).

Taastav ravimeetod tähendab invasiivset sekkumist. Professionaalseks kaariese raviks on neli võimalust – täidised, kroonid, juurekanali ravi ja hamba eemaldamine (NCBI, 2020). Need meetodid on kasutusel juhul kui hambaaugud on juba tekkinud. Kuna väikelastel on suur oht varajase lapseea kaariese tekkeks, võiks ema ka ise jälgida, kas lapse hammastes on näha muutusi (valged või pruunid laigud või täpid) ning lisaks hoolitseda isikliku suuhügieeni eest (Lee, 2013).

Üheks tõestatud ja kõige tõhusamaks meetodiks hambakaariese ennetamisel on kasutada fluoriidi sisaldavat hambapastat ja tarbida fluoriidi sisaldavat joogivett (Marinho *et al.*, 2003; Phipps, 1995). Fluoriidi sisaldavad paljud looduslikud veekogud. Leitud on, et ühiskasutatava vee fluoreerimine on kulutõhus meetod ning kasulik kõikidele vanusegruppidele (Community Preventive Services Task Force, 2014; World Health Organization, 1994). WHO 1994. aasta rapordi järgi on fluoriidi soovituslik kontsentratsioon joogivees 0,5–1,5 mg/l. Maailma erinevates piirkondades, kus joogivees leidub normist vähem fluoriidi, kasutatakse lisaks vee fluoreerimisele ka näiteks soola (Pollick, 2013) või piima fluoreerimist (Yeung *et al.*, 2015). Liiga vähene kokkupuude fluoriidiga annab võimaluse tekkida hambakaariesel, kuid liigne fluoriidi tarbimine põhjustab fluoroosi, mis tekitab samuti hammaste ja luustiku kahjustusi (Grobler *et al.*, 1986; Karro *et al.*, 2006).

Eestis on läbi viidud uurimus (Indermitte, 2010; Karro *et al.*, 2006), kus mõõdeti Eesti erinevate piirkondade joogivee fluoriidi sisaldust. Tulemustest selgus, et kraanivees oli fluoriidi kontsentratsioon Eestis keskmiselt normi piires ($0,88 \pm 0,90$ mg/l), kuid piirkonniti varieerus oluliselt (0,01 mg/l kuni 6,95 mg/l; LISA 2A, B), olles kõrgeim Lääne-Eestis ning madalaim Lõuna-Eestis.

Teine oluline tegur hambakaariese arengu takistamisel on sülge. Süljel on mitmeid kasulikke omadusi nagu hapete neutraliseerimine, antimikroobne toime ning emaili remineraliseerimine (Almeida *et al.*, 2008; Dodds *et al.*, 2015; Pitts *et al.*, 2017). Sülje puudumine võib tekitada halbade tagajärgedega muutusi, põhjustades kiiresti areneva kaariese (Loesche, 1986; Selwitz *et al.*, 2007). Sülje vähesus ning suu kuivus on seotud paljude haigustega ja ravimitega, seetõttu on selle protsessi ära hoidmine keeruline. Siiski on kliiniliste uuringutega näidatud, et närimiskummi närimine stimuleerib sülje tootmist (Dawes & Macpherson, 1992) ning selles sisalduvad polüoolid (ksüliitool, erütriitool) on anti-kariogeense toimega, kuna blokeerivad MS metabolismi, takistades suhkrumolekulidega ühinemist (Lee, 2013; Štšepetova *et al.*, 2019).

Lisaks saab hambakaariest kontrolli all hoida tervisliku toitumisega, kus hoidutakse kiiretest süsivesikutest, nagu valge suhkur, šokolaad, saiakesed, snäkid (World Health Organization, 2015).

1.2 Mutans-streptokokid

Suu mikrobiota on kompleksne ja koosneb paljudest erinevatest mikroorganismidest. Kokku on suuõõnest leitud ligi 1000 erinevat liiki (Wade, 2013). Erinevad mikroorganismid koloniseerivad erinevaid pindasid, nagu näiteks keel, hambad ja igemed. Kuigi bakterid eelistavad koloniseerida erinevaid ökonišše, on MSe leitud peamiselt hambasüvenditest, -aukudest ja -lõhedest (Marsh, 2010). Suu limaskestal kui ka hambapindadel on esindatud enamasti teised streptokokid (Avila *et al.*, 2009). Suud koloniseerivad streptokokid on jagatud viide rühma: (1) *mutans*, (2) *salivarius*, (3) *anginosus*, (4) *sanguinus* ja (5) *mitis*. Need rühmad erinevad üksteisest arvukuse, kolonisatsioonikohtade ja tekitavate nakkuste poolest (Mattos-Graner & Duncan, 2017). Enamik mikroobe on meile ohutud, aga teatud juhtudel või keskkonnatingimustes võivad tekkida infektsioonid, sealhulgas hambakaaries. Inimesel kuuluvad MS gruppi *Streptococcus mutans* ja *Streptococcus sobrinus*. Nendel bakteritel on kujunenud aja jooksul teatud eelised, et antud keskkonnas hakkama saada (Loesche, 1986).

1.2.1 Liigid ja nende levimus elanikkonnas

Streptococcus mutans on Gram-positiivne katalaas-negatiivne fakultatiivne anaeroob, mis resideerub peamiselt inimese suu mikrobiotas, aga ka neelus ja soolestikus (Forssten *et al.*, 2010; Loesche, 1986). *S. mutans*'i isoleeris J. Clarke inimese hambakaariese koldest 1924. aastal (Clarke, 1924). *S. mutans* jaotatakse nelja erinevasse seroloogilisse gruppi – c, e, f ja k. Umbes 75% hambakaariese kolletest eraldatud *S. mutans*'i tüvdest kuulub c serotüüpi (Nakano & Ooshima, 2009). *S. mutans* on põhjalikult uuritud patogeen, tüve UA159 genoom sekveneeriti aastal 2001 (Ajdić *et al.*, 2002). Lähedane liik on *Streptococcus sobrinus*. *S. sobrinus* on samuti Gram-positiivne fakultatiivne anaeroob, mis jaguneb serotüüpideks d ja g (Oho *et al.*, 2000). Nagu ka *S. mutans*, toodab ta glükoosi anaeroobse metabolismi käigus piimhapet.

Cornejo *et al.* (2013) uuringus leiti, et *S. mutans*'i pangenoom koosneb ligikaudu 3300 geenist, millest 1490 on geenid, mis on iseloomulikud kõikidele *S. mutans* tüvedele. Sellest johtuvalt arvavad Lemos *et al.* (2019), et ühes isolaadis võiks olla umbes 500 teistest tüvedest eristatavat geeni, mis võivad mõjutada konkreetse bakteritüve virulentsust. Lisaks leiti selle uuringu käigus 73 unikaalset tuumikgeeni, mida võib leida ainult *S. mutans*'i tüvedel. Neid geene ei ole leitud *S. mutans*'ile lähedastest bakteriliikidest ning enamus nendest geenidest on seotud süsivesikute metabolismi ja happe tolerantsusega (Cornejo *et al.*, 2013). Lisaks on leitud, et mõned geenid, mis on olemas *S. mutans*'i tüvedel, võivad puududa *S. sobrinus*'e tüvedel (Song *et al.*, 2012).

Need kaks bakteriliiki võivad üheskoos põhjustada hambakaariest. Paljud erinevate riikide teadusuuringud, mis on käsitletud erinevates vanusegruppides ja erinevate toitumisharjumustega patsiente, on jõudnud järeldusele, et esineb tugev seos MSide taseme ja hamba demineraliseerimise vahel (Marsh, 2010). Kuna suus ja hambakaariese koldes on keskkonnatingimused keerulised ja pidevalt muutuvad, peavad MSid taluma ja kohanema muutuva keskkonnaga. *S. mutans* on äärmiselt kohanemisvõimeline paljudele kahjulikele keskkonnatingimustele, suutes ellu jääda erinevatel temperatuuridel, kasvada happelises ja kõrge hapnikutasemega keskkonnas ning toitainete puuduses (Biswas *et al.*, 2008; Mattos-Graner & Duncan, 2017).

Levimuse kohta on saadud erinevaid tulemusi. Mõned uuringud on näidanud, et *S. mutans*'it leidub inimeste suus sagedamini kui *S. sobrinus*'t (vastavalt 61,7% ja 56,6%) (Hirose *et al.*,

1993; Okada *et al.*, 2005), teistel andmetel on kaariesega inimestel *S. mutans*'i ja *S. sobrinus*'e esinemissagedus sarnane (Mitrakul *et al.*, 2011). Tai 3–5-aastaste laste suus leiti *S. mutans* esinemist (85%) sagedamini kui *S. sobrinus* tüvesid (51%) (Saraithong *et al.*, 2015). Sarnane tulemus saadi ka Brasiilia 5–6-aastastel lastel (vastavalt 86% ja 14%) (Franco *et al.*, 2007). Paljud uuringud kinnitavad, et kui lisaks *S. mutans*'le esineb ka *S. sobrinus*, on lastel kaariese esinemissagedus suurem (Hata *et al.*, 2006; Hirose *et al.*, 1993; Okada *et al.*, 2005; Saraithong *et al.*, 2015).

1.2.2 Virulentsusfaktorid ja nende geenid

Virulentsusfaktor on patogeeni omadus või tema toodetud komponent, mis võib suurendada tema võimet põhjustada haigusi. Virulentsusfaktoreid saab kindlaks teha molekulaarbioloogiliste meetodite abil, mis aitavad leida tulevaste ravimeetodite sihtmärgid. Bakteriaalsed virulentsusfaktorid saab jagada nende funktsiooni alusel: (1) membraansed valgud, mis on olulised adhesioonil, kolonisatsioonil ja kommunikatsioonil, (2) polüsahhariidist ümbrised, mis kaitsevad bakterit, ning (3) sekretoorsed valgud, nagu toksiinid ja ensüümid (Wu *et al.*, 2008). Enamik nakkushaiguste virulentsusfaktoreid on seotud toksiinidega, seevastu streptokokkidel on kahjustuste tekitamine ja stressitaluvus seotud bakteriaalse ainevahetuse ensüümidega (Lemos & Burne, 2008).

Tabel 1. Mutans-streptokokkide virulentsusfaktorid ja neid tootvad geenid (Decker *et al.*, 2014)

Virulentsusfaktor	Geenid
Adhesioon hambaemalile	sahharoos-sõltuv adhesioon: <i>gbpA</i>, <i>gbpB</i>, <i>ftf</i>, <i>vicR</i>, <i>wapA</i> sahharoos-sõltumatu adhesioon: <i>spaP</i>
Biokile moodustamine	<i>atIA</i>, <i>ftf</i>, <i>SMU.609</i>, <i>vicR</i>, <i>wapA</i>
Polüsahhariidide tootmine	<i>gtfA</i>, <i>gtfB</i>, <i>gtfC</i>, <i>gtfD</i>, <i>ftf</i>, <i>vicR</i>
Süsivesikute lõhustamine koos happe tootmisega	<i>mipB</i>, <i>SMU.104</i>, <i>SMU.105</i>, <i>sorA</i>
Vastupidavus hapetele	<i>comD</i>, <i>SMU.1037c</i>

Mutans-streptokokkidel on mitmeid omadusi, mis võimaldavad neil hambakaariest tekitada, sh kinnitumisvõime hambaemalile, hambakatu aluseks olevate polüsahhariidide tootmine

ning süsivesikutest kiiresti ja suures hulgas hapete tootmine (Forssten *et al.*, 2010; Lemos & Burne, 2008; Marsh, 2010). Nende omadustega seostatakse mitmeid geene. Tabelis 1 on välja toodud paksemas kirjas geenid, mis valiti kirjanduse põhjal käesolevasse töösse virulentsuse uurimiseks. Ühel geenil võib olla seos mitme erineva protsessiga. Palmer *et al.* (2013) uurimuses leiti, et *S. mutans*'i geenidel on variatsioon virulentsuses. Fenotüübid olid erinevad nii biokile moodustamisel, madala pH kui ka oksüdatiivse stressi talumisel. Sellest saab järeldada, et kõik *S. mutans*'i tüved ei ole võrdselt virulentsed (Cornejo *et al.*, 2013; Lemos *et al.*, 2019; Palmer *et al.*, 2013).

1.2.2.1 Kinnitumine hambaemailile (adhesioon)

Üks MSi virulentsusfaktoritest on kohastumus kinnituda hammastele. See hõlmab sahharoosist sõltumatut (*sucrose-independent*) esialgset kinnitumist, rakk-rakk agregatsiooni, sahharoosist sõltuvat (*sucrose-dependent*) stabiliseerumist ja biokile küpsemist (Zhu *et al.*, 2006).

Adhesiooniga on seotud glükaani siduvad valgud (Gbps – *gbpA* ja *gbpB*) ning ka glükosüültransferaasid (GTF – *gtfB* ja *gtfD*). Gbps'i ja GTF'i tootvad geenid on omavahel tihedalt seotud, kuna *S. mutans* sünteesib sahharoosist (substraat GTFidele) nii vesilahustuvaid kui mitte-vesilahustuvaid glükaane glükosüültransferaaside abil (Kuramitsu, 2003). Lisaks on Gbps'ide funktsiooniks biokile struktuuri säilitamine ja akumulatsioon (Banas & Vickerman, 2003).

Gbps'e ekspresseeritakse raku pinnal ning kuigi neil puudub ensümaatiline aktiivsus, on siiski tõestatud, et *gbpA* osaleb bakteri adhesioonis hambapinnale ning aitab kaasa kariogeensusele (Matsumoto-Nakano *et al.*, 2007). Varasemalt on Hazlett *et al.* (1999) oma uurimuses näidanud, et *gbpA* puudus põhjustab muutusi biokiles ja seetõttu ka hambakatu struktuuris. Matsumi *et al.* (2015) uuringus analüüsiti Gbp ekspressiooni biokile moodustamisel. Vaadeldi GTFi kodeerivate geenide ekspressioonitaset. Töös kasutati tüvesid, millel puudus *gbpA* ja *gbpB* geen. Tulemustest täheldati, et kuigi *gbpA* puudumine ei mõjuta moodustava biomassi kogust, mõjutab *gbpA* geeni defekt siiski bakteri seondumist ja nende geenide ekspressiooni, mis kontrollivad biokile moodustamist. See viitab asjaolule, et GbpA on tõesti oluline valk stabiilse ja tugeva biokile moodustamisel. Mida tugevam ja jäigem on biokile, seda vastupidavam on ta ebasobivatele keskkonnatingimustele, näiteks stressifaktoritele nagu happed, madal pH ja antibiootikumid. Lisaks kinnitati ka antud uuringutulemustes, et *gbpA*

puudulike tüvede sahharoosist sõltuvad adhesioonid on nõrgemad ja et *gbpA* osaleb MSI hamba pinnale kinnitumisel ning kariogeensuses (Matsumi *et al.*, 2015).

GbpB on erinev teistest *S. mutans*'is ja *S. sobrinus*'es Gbps'e ekspresseerivatest geenidest (Matsumoto-Nakano *et al.*, 2007). *GbpB* bioloogiline funktsioon on veel ebaselge, kuid on leitud, et ta vastutab glükaani siduva valgu B tootmise eest, mille aktiivsus on üsna madal (Mattos-Graner *et al.*, 2006). Arvatakse, et *gbpB* kontrollib rakuseina stabiilsust ja peptidoglükaani hüdrolaasi aktiivsust (Chia *et al.*, 2001), kuna sisaldab homoloogilisi aminohappeid CHAP perekonnaga, mis on seotud nende samade ülesannetega. Mattos-Graner *et al.* (2006) uuringus prooviti saada mutans-streptokokke, millel puuduks *gbpB* geen, kuid see ei õnnestunud. Tehti järeldus, et võimetus saada elujõulisi *gbpB* mutante võib olla seotud asjaoluga, et *gbpB* geeni produktil on oluline funktsioon. Siiski leiti, mis kinnitab ka Chia *et al.* (2001) uurimustööd, et *gbpB* osaleb peptidoglükaani sünteesis ning lisaks ka rakkude jagunemises ning biokile moodustamisel. Seda kinnitab ka Matsumoto-Nakano *et al.* (2007) teadustöö. Veel uuriti *gbpB* ülesandeid stressivastustes ning saadud tulemused viitavad sellele, et *gbpB* on oluline geen ka bakterite kasvu jaoks (Mattos-Graner *et al.*, 2006). Lynch *et al.* (2013) uuring näitas, et *gbpB* vähenemine kahjustas sahharoosist sõltuva biokile moodustamist.

Veel üheks oluliseks adhesiooni- ja kolonisatsiooni faktoriks MSil on geen *spaP* (ka *pac*, P1 ja Ag I/II), mis toodab pinnavalku nimega antigeen I/II (Ono *et al.*, 1994). *spaP* funktsiooniks on vahendada *S. mutans*'i adhesiooni süljega kaetud hambapindadega. Selle käigus interakteerub ta spetsiifilise sülje komponendi glükoproteiiniga – süljeaglutiniiniga (SAG) (Kelly *et al.*, 1995). SAG omab tsüsteiinirikkaid (SRCR – *scavenger receptor cysteine rich*) domeene ning nende konserveerunud peptiidijärjestusi tunneb omakorda ära *spaP* (Brady *et al.*, 2010). See geen on streptokokkides üsna laialt levinud ning kuigi valk on konserveerunud 70–90% ulatuses (Brady *et al.*, 2010), võib valgu funktsioon erinevates streptokokkides erineda (Jenkinson & Demuth, 1997). Hiljuti on avastatud, et *spaP* adhesiinid jagunevad A- ja B-genotüüpideks, mis võivad põhjustada kas suuremat virulentsust ja adhesiooni tugevnemist või vastupidiselt adhesioonivõime kadumist ja retseptori puudumist rakupinnal (Esberg *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2019). Kuna arvatakse, et antigeen I/II mängib olulist rolli MS kolonisatsioonil (Jenkinson & Demuth, 1997), siis on sellega seoses läbi viidud ka mitmeid uurimusi. Näiteks Crowley *et al.* (1999) töös nakatati rotte *S. mutans*'i tüvedega, kus ühel tüvel oli *spaP* geen olemas, teisel mitte. Lisaks toideti rotte, enamikele uurimustöödele

vastupidiselt, vähese suhkrusisaldusega dieediga. Tulemustest selgus, et *spaP* geen on tõesti koloniseerimisel oluline ja virulentsust suurendav, kuid mitte ilmingimata hädavajalik.

1.2.2.2 Biokile moodustamine

Teine oluline virulentsusfaktor on biokile moodustamine. Biokile on mingile pinnale kinnitunud mikroorganismide kogum, mis on enamasti kaetud eksopolüsahhariididest koosneva matriksiga (Costerton, 1999; Marsh, 2010). Lisaks kinnitumisele aitab biokile baktereid kaitsta ning soodustada ellujäämist keerulistes keskkonnatingimustes (Shemesh *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2019; Zhu *et al.*, 2006). See omadus suurendab nende kariogeenset potentsiaali ja selles protsessis osalevad mitmed pinnavalgud. Pärast biokile moodustumist jäävad bakterid paikseks ja on näha nende fenotüübi suurt eristumist vabalt elava bakteri fenotüübist (Marsh, 2005). Biokiles elavad bakterid on oluliselt tolerantsemad antibiootikumidele ja biotsiididele (Hall-Stoodley *et al.*, 2004). Arvatakse, et need muutunud omadused tekivad tänu muudatustele geeniekspressiooni mustrites (Shemesh *et al.*, 2007).

WapA on pinnavalk, mida võib kohata ka antigeen A või antigeen III nime all. Zhu *et al.* (2006) läbi viidud uuringus vaadeldi *wapA* funktsiooni rakupinna struktuuris ja biokile moodustumisel. Eemaldatud *wapA* geeni puhul vähenes rakk-rakk agregatsioon, muutus pinnastruktuur ning ka biokile ehitus oli struktureerimata. Lisaks leiti, et rakkudel, millel oli *wapA* eemaldatud, oli pind vähem kleepuv. Siit võib järeldada, et WapA valgul on oluline roll, kuid need erinevused muutusid, kui söötmes tõsteti sahharoosi taset. Sahharoos surus alla *wapA* ekpressiooni nii vabalt elavas rakus kui biokiles, aga see on ilmselt seotud asjaoluga, et *wapA* osaleb tõenäolisemalt sahharoosist sõltumatus rakk-rakk agregatsioonis kui sahharoosist sõltuvas adhesioonis (Zhu *et al.*, 2006).

Streptokokkidel on ka konserveerunud geen *vicR*, mis on vastuse regulaator ning kuulub *vicRK* kahekomponendilisse süsteemi (TCS – vt peatükk 1.2.2.5), mis aitab bakteril tuvastada keskkonna muutusi ja reageerida stressitingimustele. Lisaks on tal oluline roll suhkru metabolismis ja biokile moodustamisel. TCSi vastuse regulaatorid osalevad *S. mutans*'i geenide reguleerimisel happelises keskkonnas (Liu *et al.*, 2015). Lei *et al.* (2015) uurimustöös leiti, et *vicRK* kahekomponendiline süsteem reguleerib *S. mutans*'is virulentsusgeene, mis on seotud biokile matriksi sünteesiga. Mutant-tüve abil selgitati, et biokile on arhitektuuriliselt muutunud ning järeldati, et see geen on seotud eksopolüsahhariidide struktuuriliste omaduste reguleerimisega (Lei *et al.*, 2015). Varasemates uuringutes on leitud, et nii *vicK* kui *vicR* on

seotud paljude teiste geenidega, näiteks reguleerib *vicR* otseselt *gtfB*, *gtfD*, *gbpB* ja *fff* ekspressiooni. *VicK* puudumisel on need geenid allareguleeritud. See mõjutab *S. mutans*'i olulisi füsioloogilisi tegureid ja biokile fenotüüpi (Senadheera *et al.*, 2005). Mattos-Graner *et al.* (2006) uuringus vaadeldi samuti *vicRK* süsteemi ning leiti, et *vicR* mutatsioon bakteri tüvedes oli letaalne ning arvati, et see tulenes aktivatsiooni kadumisest ja *gbpB* ekspressiooni puudumisest. Eeldatakse, et *vicR* ekspresseerub oma olulisuse tõttu edasi *vicK*-mutantides (Mattos-Graner *et al.*, 2006). Ka teistes töodes on näidatud, et *vicR* on *S. mutans*'ile hädavajalik, kuid erinevates streptokoki liikides see olulisus erineb ning põhjus pole selgelt teada. Ilmselt hõlmab *vicRK* erinevaid liigispetsiifilisi gene, millel on eri roll peptidoglükaani sünteesil, raku jagunemisel, rakuseina homöostaasis ja immuunsuses (Mattos-Graner & Duncan, 2017; Senadheera *et al.*, 2005). Samuti on teada, et ka *vicRK* ekspressioon on *S. mutans*'il erinevates kasvufaasis muutuv, olles varajases eksponentsiaalses kasvufaasis madalam kui keskmises ja hilises faasis (Tremblay *et al.*, 2009).

1.2.2.3 Eksopolüsahhariidi ehk EPS tootmine

Järgmine omadus, mis põhjustab suuremat virulentsust, on võime toota sahharoosist rakuväliseid polüsahhariide (Bowden & Hamilton, 1998). Sahharoos on ainuke süsivesik toidus, mida streptokokid suudavad muuta eksopolüsahhariidiks (EPS), kuna glükoosi ja fruktoosi jääkide vahel on energiarikas glükosiidside, millest saab EPS sünteesiks vajalikku energiat (Forssten *et al.*, 2010). Selleks toodavad MSid oma rakuseinal glükosüültransferaase (GTF), mis on olulised nii adhesioonil kui ka biokile glükaani polümeeride moodustumisel. EPSid on olulised komponendid biokiles (Rölla, 1989) ning aitavad kaasa *S. mutans*'i kariogeensusele, stressitaluvusele ja antimikroobsele resistentsusele (Lei *et al.*, 2015). Samuti on EPSide ülesandeks tagada substraatide varu bakteri jaoks, aidata kaasa adhesioonile ja mikroorganismide omavahelisele agregeerumisele, suurendada hambakatu paksust ja tihedust. Lisaks toimivad vees lahustumatud (*water-insoluble*) EPSid kui tõke, hoides toodetud hapet hambapinna läheduses. Peamiselt on seotud biokile kasvuga vees lahustuvad (*water-soluble*) EPSid, kuid on leitud, et bakteril, mis ei sünteesi vees lahustumatuid glükaane, on virulentsus vähenenud (Shellis & Dibdin, 1988). Erinevad uurimistööd on näidanud, et kui eemaldada ükskõik milline *gtf* geen, väheneb loomudelites virulentsus. Glükaani moodustamisel on oluline roll aproksimaalse (*smooth surface*) kaariese tekkel, kuna see aitab MSil kindlalt hamba pinnale kinnituda (Yamashita *et al.*, 1993). EPSi tootmine sõltub bakteri kasvufaasist,

toitainete kättesaadavusest ja keskkonnatingimustest. Seda kinnitas Decker *et al.* uuring, kus leiti, et *S. mutans*'i kultuuris suurenes EPSi produktsioon aja möödudes (Decker *et al.*, 2014).

Glükosüültransferaasi kodeerivateks geenideks on *gtfB*, *gtfC* ja *gtfD* (Loesche, 1986). *GtfB* kodeerib valku nimega glükosüültransferaas-I, mis produtseerib vees lahustumatuid glükaane. Geen *gtfD* kodeerib vees lahustuvaid glükaane sünteesivat ensüümi glükosüültransferaas-S (Yamashita *et al.*, 1993). Nad erinevad üksteisest glükosiidsidemete poolest (Matsumoto-Nakano, 2018). Ei ole selge, miks on MSil mitmeid glükosüültransferaase, aga teatakse, et nende afiinsus bakteri pinnale on erinev. Arvatakse, et need kõik on olulised polüsahhariidide tootmisel ja kaariese tekkes, kuid vees lahustumatul glükaanil, mida kodeerib *gtfB*, on kõige olulisem roll (Banas, 2004). *In vitro* katsetes on leitud, et *gtfB* produktid on vajalikud suhkrust sõltuval kolonisatsioonil hambapinnal, kuid *gtfD* geen ei ole hädavajalik (Hanada & Kuramitsu, 1989). Lisaks on avastatud hiljuti, et tüved, millel olid kahjustused glükaani produktsioonil, olid happele tundlikumad. See viitab, et vees lahustumatud glükaanid võivad olla oluliseks faktoriks happe tootmisel ja talumisel (Guo *et al.*, 2015). Ka Klein *et al.* (2010) leidsid oma uurimuses, et happelises keskkonnas on ülesreguleeritud EPSi tootvad geenid, eriti *gtfB*. Lisaks võib see samuti viidata seosele happetaluvusega (Klein *et al.*, 2010). Keskkonna pH languse mõjul hakkavad tööle kaitsemehhanismid ja üks nendest on toota EPSi, mis suurendab biokile tihedust ja kaitseb baktereid ebasobivate keskkonnatingimuste eest.

Ftf (teise nimega *sacB*) kodeerib fruktosüültransferaase (FTF), mille abil sünteesivad nii *S. mutans* kui *S. sobrinus* sahharoosist rakuväliseid fruktaanipolümeere (Rozen *et al.*, 2004; Sato & Kuramitsu, 1986). Rozen *et al.* (2004) töös uuriti *S. mutans*'is FTF sekretsiooni. Sahharoosi sisaldavas keskkonnas kasvavatel MSidel leidis tõesti FTF nii rakupinnal, biokiles kui ka rakuvabalt süljes ning see omas kõrget afiinsust glükaanide suhtes. See viitab, et nii fruktaanid kui glükaanid on biokilede moodustamisel oluliseks osaks. Fruktaanid võivad soodustada bakterite adhesiooni. Munro *et al.* (1991) uurimistöös näidati, et rottidel, keda nakatati *S. mutans*'iga, millel puudus *ftf* geen, vähenesid kaariese kahjustused. MSid suudavad toota fruktaane lühiajaliselt suurtes kogustes ning need võivad mõjutada hambakaariese patogeneesi, olles rakuväliseks süsivesikute säilituskohaks, mida bakterid saavad toitainete puudusel metaboliseerida (Sato & Kuramitsu, 1986). Need fruktaanid hüdrolüüsitakse vajadusel kiiresti fruktoosiks ja seejärel kääritatakse. Metaboliseerimise käigus vabaneb piimhape, mis kahjustab hambapinda (Jacques, 1993). Lisaks võivad nad soodustada bakterite seondumist kõvadele pindadele (Rozen *et al.*, 2004).

1.2.2.4 Orgaaniliste hapete tootmine süsivesikutest

Oluliseks virulentsusfaktoriks on MSil veel hapete tootmine (*acidogenicity*) (Loesche, 1986). See on oluline konkurentsieelis teiste liikidega. MSid käärivad süsivesikuid ja toodavad neist orgaanilisi happeid, eelkõige piimhapet, muutes väliskeskkonna pH taset. Selle tõttu kiirendavad nad hamba demineraliseerumist (Matsui & Cvitkovitch, 2010). Ka mitmed teised bakterid on selleks võimelised, kuid nende happeproduktsoon on tunduvalt aeglasem. Kiirema happe produktiooni tõttu pikeneb aeg neutraalse pH keskkonna taastamiseni pärast söömist (Banas, 2004). Ühes uuringus vaadeldi bakterikooslusi neutraalses ning happelises keskkonnas. Mida happelisemaks muutus keskkond, seda suurema hulga moodustasid bakterikoosluses MSid ja laktobatsillid. Lisaks liikide arvukuse kasvule tõusis märkimisväärselt ka happeproduktiooni kiirus (Bradshaw *et al.*, 1989). Samas on leitud *S. mutans*'i ja *S. sobrinus*'e hapete tootmise võimes tüvede-vahelisi erinevusi (Banas, 2004).

Piimhapet tootvad bakterid, sealhulgas *S. mutans* ja *S. sobrinus*, sõltuvad oma energia tootmisel ja kasvamisel sahharolüütilisest aktiivsusest. Selle tõttu on suhkrute transport ja metabolism nendes mikroorganismides väga oluline (Zeng & Burne, 2016).

Geenid, mis vastutavad *S. mutans*'is ja *S. sobrinus*'es süsivesikute metabolismi ja happe produktiooni eest on *SMU.104* ja *SMU.105*. *SMU.105* on LacI perekonna valgu periplasmaatiline ja suhkrut siduv domeen. Periplasmaatilised siduvad valgud on peamiselt retseptoriteks suhkrupõhiste ainete transpordil ning LacI perekond koosneb transkriptsiooni regulaatoritest. Selle suhkrut siduv domeen kontrollib suhkrut sidudes tarbimisradasid (Lewis *et al.*, 1996). *SMU.104* kodeerib α -glükosidaasi glükosüülhüdrolaasi. *SMU.105* on tõenäoliselt kaasatud transkriptsiooni ja energia metabolismi ning on oluline suhkrute fermetatsioonil (Shemesh *et al.*, 2007).

Nii *SMU.104* kui *SMU.105* arvatakse kuuluvat *S. mutans*'i *nigBCDAER* lookusesse. See lookus sisaldab kuut geeni (*SMU.100-105*) ning töötab ilmselt operonina. *NigBCDAER* lookuses ekspresseeritakse oletatavat repressorit *NigR*, mida kodeerib *SMU.105*. Lisaks ekspresseeritakse nimetatud lookuses ensüümi tootvat *NigE*, mida kodeerib *SMU.104* (Ajdic & Chen, 2013). Nad vahendavad suhkru fosfotransferaassüsteemi (PTS) regulatsiooni, seondudes efektori puudumisel geeni või operoni promootorpiirkonnaga (Weickert & Adhya, 1992). PTSi ülesanne on mitmete suhkru substraatide sidumine, transport ja fosforüülimine (Ajdic & Chen, 2013). Selle tulemusel blokeerivad nad kas RNA polümeraasi seondumise või

destabiliseerivad kompleksi ning tagajärjeks on PTS repressioon spetsiifilise suhkru puudumisel (Weickert & Adhya, 1992). Nii Ajdic ja Chen (2013) kui ka Liu *et al.* (2015) uurimuses nähti, et see sama PTS võib olla seotud *S. mutans*'i *gtfB* poolt sünteesitud süsivesikute transpordi ja metabolismiga. Lisaks leiti Liu *et al.* (2015) uurimuses, et *SMU.105* võib olla seotud glükogeeni omastamisega kuumuses tekkiva stressi all, kuna pidas vastu kõrgetel temperatuuridel.

1.2.2.5 Vastupidavus happelises keskkonnas

Bakterid on pidevalt mõjutatud keskkonnatingimuste poolt nagu pH, osmootne rõhk, temperatuur, toitainete kättesaadavus, toksilised kemikaalid jne. Lisaks toodavad MSid ka ise süsivesikute metabolismi kaudu happeid, mis võivad muuta keskkonna pH-d neutraalsest kuni pH 3,0-ni ning sellistes tingimustes on nad sunnitud ise samuti hakkama saama (Matsui & Cvitkovitch, 2010). Et selliseid tingimusi üle elada, peavad bakterid suutma suhelda mitte ainult üksteisega, vaid lisaks tajuma ja reageerima ka keskkonnast tulevatele signaalidele. Üks omadus, mis eristab MSe teistest bakteritest, on happetaluvus (*aciduricity*) (Loesche, 1986). Mida happelisemaks muutub suus keskkond, seda tõenäolisemalt suureneb ka MSide või laktobatsillide hulk, kuna nad on sellistele tingimustele vastupidavamad ja omavad mitmeid erinevaid happetaluvuse mehhanisme (Marsh, 2010). Bradshaw *et al.* (1989) uurimuses vaadeldi inimese suus elavaid baktereid normaalse pH tingimustes, kus kariogeensed liigid, *Streptococcus mutans* ja *Lactobacillus rhamnosus*, moodustasid vaid 1% mikroobikooslusest. Kui söötmesse lisati glükoosi, kuid pH jäeti neutraalseks, püsis kooslus enam-vähem muutusteta. Mikrobioota tasakaal hakkas nihkuma, kui pH-l lasti langeda tänu bakteriaalsele metabolismile: sel juhul suurenes oluliselt MSide ja laktobatsillide osakaal (Bradshaw *et al.*, 1989). See kinnitas varasemaid uuringuid, kus samuti täheldati, et hambakatus suureneb MS hulk, kui keskkonda lisati madala pH-tasemega puhvreid (Svanberg, 1980).

Seda, kuidas bakterid kohanevad keskkonnamuutustega, reguleerib osaliselt kahekomponendiline süsteem (TCS) (Mattos-Graner & Duncan, 2017). See on oluline osa MS virulentsusest. TCS koosneb signaalitundlikust (*signal sensing*) histidiin-kinaasist (HK) ja vastuse regulaatorist (RR – *response regulator*). Need mängivad bakterite patogeensuses olulist rolli, kuna võimaldavad tuvastada mitmesuguseid keskkonna muutusi, stressi ning seejärel nendele reageerida (Senadheera *et al.*, 2005).

Mitte kõik HKd ja RRd ei ole igas tüves kodeeritud ning TCSide arv võib eri tüvede vahel varieeruda (Biswas *et al.*, 2008). See erinevus võib viidata, et erinevatel tüvedel on erinev reageerimisviis ja kohanemine keskkonnale ning seeläbi teistsugune ellujäämisvõime (Song *et al.*, 2012). Keskkonnaga adapteerumise geenid, mida on rohkem kui selles vaadeldavas magistritöös, võivad nende omaduste tõttu olla MS tüvede jaoks hädavajalikud. Lisaks on happelise keskkonnaga võitlemiseks veel palju erinevaid süsteeme, mille eest vastutavad erinevad geenid, kuid neid käesolevas töös ei kajastata.

Üheks TCSideks *S. mutans*'is on TCS-7, mis koosneb *SMU.1037c*'st, mis on HK ning *SMU.1038c*'st, mis on RR. TCS-7 on sarnane *vicKR* ülekandesüsteemiga (Shemesh *et al.*, 2007). *SMU.1037c* geeni (võib leida ka nime all *phoR*) funktsiooniks on aidata bakteril keskkonnaga adapteeruda. See sisaldab HAMP domeeni sisaldavat HKd, mis on osa TCSidest (EMBL-EBI). HAMP domeen muundab moodulite vahel liikuvaid eri tüüpi mehaanilisi signaale (Song *et al.*, 2012). Lisaks leiti Shemesh *et al.* (2007) uuringus, et *SMU.1037c* on biokile moodustamisel järjepidevalt ja märkimisväärselt ülesreguleeritud.

2 Uurimus

2.1 Töö eesmärgid

Hambakaariest põhjustavaid baktereid on vajalik uurida, kuna kaaries ning selle tagajärjed võivad põhjustada inimesel suuri ebameeldivusi. Hambakaaries tekitab tugevat valu, tema tagajärgedega võib kaasneda süsteemne põletikuseisund ning kaariese ravi on kallis ja võib kesta kogu elu.

Sellest tulenevalt on käesoleva uurimistöö eesmärkideks välja selgitada kaariest tekitavate mutans-streptokokkide (*Streptococcus mutans*, *Streptococcus sobrinus*) virulentsusfaktorid ja võrrelda saadud geneetilist infot kirjanduse andmetega ning eelnevalt patsientidelt kogutud kliiniliste andmetega, et hinnata võimalikke erinevusi kahe liigi kariogeensuses.

2.2 Materjal ja metoodika

2.2.1 Kasutatud bakteritüved ja tüvede identifikatsioon

Uuringuteks valiti 40 mutans-streptokokkide tüve, millest 21 kuulusid liiki *Streptococcus mutans* ja 19 kuulusid liiki *Streptococcus sobrinus* (LISA 3). Tüved asuvad Tartu Ülikooli bio- ja siirdemeditiini instituudi mikrobioloogia osakonnas asuvas HUMB kollektsioonis (Inimese Mikrobioota Biopank) (http://eemb.ut.ee/humb/main_list.php). Tüved pärinevad Jana Olaki doktoritöö raames tehtud uuringust (Olak, 2013), mille läbiviimiseks saadi Tartu Ülikooli inimuuringute eetika komitee luba (protokoll nr 166/T-7). Tüved on varasemalt mass-spektromeetriselt samastatud Jana Olaki ja Tiiu Rööpi poolt. Tüvede doonoriteks olid emad ja lapsed, kellest tehti juhuvalik ning käesolevasse töösse sattus 24 last vanuses 24 kuni 41 kuud ning 13 ema vanuses 22 kuni 31.

Uuritavatest tüvedest tehti väljakülv veriagarplaadile, mis oli eelnevalt märgistatud tüve, kuupäeva ja bakteri liigiga. Külvid pandi kasvama mikroaeroobsesse inkubaatorisse 37 °C juurde 3 päevaks. Seejärel tehti välja kasvanud kolooniatest steriilse tampooniga ümberkülv teisele märgistatud veriagarplaadile, millel lasti kasvada inkubaatoris 37 °C juures 2 päeva. Seejärel viidi protokoll järgi läbi DNA eraldamine.

2.2.2 Doonorite kliinilised andmed

Olaki doktoritöö raames koguti doonoritelt info DMF indeksi ja SM skoori kohta. Saadud kliinilisi andmeid võrreldi bakteriaalse geneetilise infoga. DMF indeks saadi hambaarsti külastuse käigus hammaste visuaalsel hindamisel. SM skoori andmed saadi kahe analüüsimeetodi kombineerimisel: esmalt mõõdeti mutans-streptokokkide hulk kommertsiaalse kiti Dentocult® SM Strip mutans abil (Orion Diagnostica Oy, Espoo, Finland) ning seejärel külvati testribal kasvanud kolooniad veriagarsöötmele edasiseks liigi määramiseks Maldi-TOF meetodi abil (*S. mutans* või *S. sobrinus*).

2.2.3 DNA eraldamine

DNA eraldamiseks kasutati QIAamp® DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Saksamaa). Eppendorfi viaalid märgistati tüve ja bakteri liigiga. Eppendorfi tuubi pipeteeriti 200 µl ensümaatilist lüüsipuhvrit (20 mM TrisCl, pH 8,0; 2 mM EDTA; 1,2% Triton® X-100; 20 mg/ml lüsoosoomi, millest viimane lisati vahetult enne kasutamist). 10 µl steriilse külviaasaga võeti Petri tassilt kasvanud kindla bakteritüve koloonia ning asetati sama tüve Eppendorfi tuubi. Rakud suspendeeriti lüüsipuhvrts. Peale seda asetati Eppendorfi tuubid Biosan CH-100 termostaati, inkubeeriti 30 min 37 °C juures. Seejärel pipeteeriti tuubidesse 25 µl proteinaas K kontsentratsiooniga 20 mg/ml, misjärel teostati edasised protseduurid vastavalt tootja poolt kaasas olevale protokollile (QIAGEN, 2011). DNA proovid säilitati -20 °C juures.

2.2.4 PCR ehk polümeraasi ahelreaktsioon

PCR reaktsiooni jaoks kasutati 2 µl eelnevalt eraldatud DNAd. PCR reaktsioonisegu üldmahuga 25 µl koosnes järgmistest komponentidest: 12,5 µl 2X DreamTaq Hot Start PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific, USA), 6,5 µl H₂O, 2 µl praimer 1 (forward), 2 µl praimer 2 (reverse) (tööks valitud praimerid on toodud välja Tabelis 2) ning 2 µl uuritavat DNAd. PCR reaktsioon viidi läbi Eppendorf Mastercycler® Gradient thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Saksamaa) masinas.

PCR viidi läbi järgmistel tingimustel:

- DNA esialgne denaturatsioon: 94 °C, 5 minutit
- 34 tsüklit:
 - DNA kaksikahelate denaturatsioon: 94 °C, 1 minut
 - Praimerite seondumine DNA-le (temperatuur iga geeni jaoks on välja toodud Tabelis 2), 1 minut
 - DNA süntees: 72 °C, 1 minut
- Lõppekstensioon: 72 °C, 10 minutit

Tabel 2. Töös uuritud virulentsusgeenide praimerid

Märklau- geen	Geeni produkt	Praimer (5'–3')	Viide	Seendu- mistemp. DNAle (°C)
gbpA SMU.2112	Glucan-binding protein A	F: 5'- TAA TTT GAC GGC CCT TTG TC -3' R: 5'- CTG CCG AGC GTA TCA GTA CA -3'	Gilbert <i>et al.</i> , 2014	Sm 60 Ss 60
gbpB SMU.1396	Glucan-binding protein B	F: 5'-CAA CAG AAG CAC AAC CAT CA-3' R: 5'-TGT CCA CCA TTA CCC CAG T-3'	Tabchoury <i>et al.</i> , 2008	Sm 56 Ss 56
spaP SMU.610	Cell surface antigen I/II	F: 5'-AAC GAC CGC TCT TCA GCA GAT ACC-3' R: 5'-AGA AAG AAC ATC TCT AAT TTC TTG-3'	Ono <i>et al.</i> , 1994	Sm 59 Ss 59
wapA SMU.987	Cell wall-associated protein A	F: 5'- CTA TTA CTT TCC CAG ATG AAG-3' R: 5'- GTT AAC ATC TGG ACT TAT TGG-3'	Zhu <i>et al.</i> , 2006	Sm 55 Ss 55
ftf SMU.2028	Fructosyltransferase	F: 5'-AAA TAT GAA GGC GGC TAC AACG-3' R: 5'-CTT CAC CAG TCT TAG CAT CCT GAA-3'	Shemesh <i>et al.</i> , 2007	Sm 59 Ss 59
gtfB SMU.1004	Glucosyltransferase B	F: 5'-ACA CTT TCG GGT GGC TTG-3' R: 5'- GCT TAG ATG TCA CTT CGG TTG-3'	Li <i>et al.</i> , 2018	Sm 58 Ss 47
gtfD SMU.910	Glucosyltransferase-I	F: 5'-ACA GCA GAC AGC AGC CAA GA -3' R: 5'-ACT GGG TTT GCT GCG TTT G -3'	Shemesh <i>et al.</i> , 2007	Sm 59 Ss 61
vicR SMU.1517	Histidine kinase two-component regulatory system	F: 5'-CGC AGT GGC TGA GGA AAA TG-3' R: 5'-ACC TGT GTG TGT CGC TAA GTG ATG-3'	Senadheera <i>et al.</i> , 2005	Sm 58 Ss 58
SMU.1037c	HAMP domain-containing histidine kinase	F: 5'-TTC GAA CAC CCT TGA CCA TTG-3' R: 5'-CCA AAT CGG CTG CAT CAA CT-3'	Shemesh <i>et al.</i> , 2007	Sm 55 Ss 60
SMU.104	α-Glucosidase glycosyl hydrolase	F: 5'-GCA GGG ATT CGT GCA TTT G-3' R: 5'-AAT CGA AGG TTG CAG GCT CTT-3'	Shemesh <i>et al.</i> , 2007	Sm 56 Ss -
SMU.105	Periplasmic binding and sugar binding domain of LacI family protein	F: 5'-TTC CCA ATG CTA GAG CTC GG-3' R: 5'-AAG GAC TCC ACG TCG TTG GT-3'	Shemesh <i>et al.</i> , 2007	Sm 59 Ss 60

Sm – *Streptococcus mutans*; Ss – *Streptococcus sobrinus*

2.2.5 Praimerite temperatuuri optimeerimine

Mõlema bakteriliigi jaoks tehti gradient-PCR, et selgitada välja, millisel temperatuuril otsitavad geenid on kõige paremini määratavad. Gradient viidi läbi nagu PCR. Reaktsioonisegu oli üldmahuga 25 µl ning koosnes samadest komponentidest, kuid kindla temperatuuri asemel valiti temperatuurivahemik (47–61 °C). Eppendorf Mastercycler® Gradient thermal cycler (Eppendorf, Hamburg, Saksamaa) masinasse asetati 12 sama tüve proovi, milles igas Eppendorfi tuubis toimus praimerite seondumine DNAle erineval temperatuuril. Pärast geelelektroforeesi läbiviimist valiti iga geeni jaoks sobivaim temperatuur. Tabelis 2 on toodud sobivaimad praimerite seondumistemperatuurid DNAle.

2.2.6 Geelelektroforees

PCR produktid lahutati 1,2%-lises agarosgeelis. Geel sisaldas 0,5xTAE puhvrit ja 5 µl EtBr lahust (kontsentratsioon geelis 10 mg/ml). 10 µl PCR produktidele lisati 2 µl 6X Orange LD Loading Dye (Thermo Fisher Scientific, USA) värvi ning saadud segu pipeteeriti geelile. Äärmistele radadele lisati 3 µl Gene Ruler 1kb DNA Ladder (Thermo Fisher Scientific, USA) markerit. Geeli jooksutati CHEF DR II (Bio-Rad, Hercules, California) masinas pingega 150 mV ligikaudu 15 minutit. Geel ilmutati UV-valguse käes Syngene™ (Synoptics Ltd, Cambridge, Inglismaa), et näha, kas otsitud geenid olid valitud tüvedel olemas. Geelipilt jäädvustati programmis GeneSnap from SynGene.

2.2.7 Genotüüpiseerimine

Genotüüpiseerimine viidi läbi kasutades Simpson *et al.* (2002) töös kasutatud meetodi modifikatsiooni. Genotüüpiseerimist aitas läbi viia juhendaja Jelena Štšepetova. *Streptococcus* tüvesid kultiveeriti infusioonpuljongis (Difco, Detroit, MI, USA) üle öö 37 °C juures. Seejärel rakud tsentrifuugiti 10 000 p/m juures 7 min, pesti 2 korda 75 mmol/l NaCl ja 25 mmol/l EDTA-ga (pH 7,4) ning suspendeeriti 150 µl-s samas puhvris. Rakususpensioon kuumutati 50 °C-ni ja segati 150 µl 2% madala sulamistemperatuuriga agarosiga 0,5xTBE puhvris ning valati vormidesse enne agarooi tahenemist. Seejärel tahenenud agarooi inkubeeriti lüüsipuhvris [50 mmol/l EDTA, pH 8,5; 0,5% Na-lauroülsarkosiin; 0,2% Na-desoksükolaat (sisaldas 2 mg lüsosüümi (Sigma) ja 10 U mutanolüsiini (Sigma) milliliitri kohta)] üle öö 37 °C juures. Pärast lüsoosoomi seguga töötlust, töödeldi agarooi lahuses, mis sisaldas: 10 mmol/l Tris; 0,5 mol/l EDTA (pH 8,5); 1% naatriumdodetsüülsulfaat ja 2 mg/ml proteinaas

K, 50 °C juures üle öö. Agaroosiblokke pesti kolm korda 75 mmol/l NaCl ja 25 mmol/l EDTA'ga (pH 7,4). Restriktsioon viidi läbi ensüümidega *SmaI* ja *ApaI* (Fermentas, USA) 37 °C juures üle öö. Elektroforees teostati CHEF DR II (Bio-Rad, Hercules, California) masinaga 5xTBE puhvris. Impulsi aeg oli 1 kuni 15 sek, voolutugevus 6 V, temperatuur 14 °C. Geeli jooksutati *SmaI* ensüümi korral 22 tundi ja *ApaI* korral 20 tundi. Agaroosgeel värviti etiidiumbromiidiga (0,5 µg/ml) ja visualiseeriti UV-valguses.

2.2.8 Statistiline analüüs

Andmed salvestati ja analüüsiti tarkvaraprogrammis MS-Excel. Korrelatsioonanalüüsiks, et võrrelda virulentsusgeenide seost kaariesemarkeritega, kasutati programmis PAST (versioon 4.02) Spearman's r_s korrelatsioonitesti ($p < 0,05$) ning seoste analüüsimiseks Pearson's Chi-Square testi ($p < 0,05$).

2.3 Tulemused ja arutelu

Antud magistritöös analüüsiti TÜ BSMI mikrobioloogia osakonnas asuvast HUMB kollektsioonist pärinevaid *Streptococcus mutans* ja *Streptococcus sobrinus* tüvesid. Tüved ning tüvede doonorite suu tervise parameetrid olid kogutud Jana Olaki doktoritöö raames (Olak, 2013), kus uuriti emade ja laste suu tervist. Käesolevas töös uuritud tüved olid valitud juhuslikkuse alusel, et saada enam-vähem võrdsel arvul nii *S. mutans*'i tüvesid ($n = 21$) kui *S. sobrinus*'e tüvesid ($n = 19$), teadmata, kas uuritavad lapsed on seotud valitud vanematega.

2.3.1 Doonorite kliinilised andmed

Kuna käesoleva töö eesmärk on võrrelda suutervise näitajaid bakterite geneetilise infoga, siis on Tabelis 3 välja toodud uuritavate patsientide kliiniline informatsioon. Tabelis 3 esitatud andmed tüvede doonorite kohta on kogutud varasemalt Olaki doktoritöö teostamise käigus (Olak, 2013). Hambakaariese seisundi hindamiseks on kasutatud WHO kaariese diagnostikakriteeriume (eelnevalt kirjeldatud peatükis 1.1.1). Maksimaalne dmft tase lapsel saab olla 20, DMFT tase täiskasvanul 28 (või 32 kui on olemas ka tarkusehambad) ning suurim DMFS tase võib olla 28 hamba kohta 128 (World Health Organization, 1997). Lisaks on toodud ka tüvede doonorite andmed kahe mutans-streptokoki esinemise ja hulga kohta. SM taset hinnatakse numbrilise skooriga vahemikus 0 kuni 3.

Tabel 3. Uuritud mutans-streptokokkide tüvede doonorite kliinilised parameetrid (keskmine \pm SD)

Uuritavad	Sugu %		Vanus (aastat)	dmf (0–20)	DMFS (0–128)	DMFT (0–32)	SM skoor (0–3)
	N	M					
ema ($n = 13$)	100	0	27,3 \pm 3,70	-	20,8 \pm 14,62	11,2 \pm 5,18	2,23 \pm 0,93
laps ($n = 24$)	62,5	37,5	2,7 \pm 0,45	0,46 \pm 0,83	-	-	1,46 \pm 1,22

SD – standardhälve; dmft – *decayed/missing/filled*; DMFS – *decayed/missing/filled surface*; DMFT – *decayed/missing/filled teeth*; SM – *Strip mutans* (Orion Diagnostica)

Valimis oli 13 ema ning 24 last, neil kõigil esines kaaries. Uuritud lastest 62,5% olid tüdrukud ja 37,5% poisid. Emade vanus jäi vahemikku 22–36 aastat, olles keskmiselt 27 aastat. Lapsed olid keskmiselt 2 aasta ja 7 kuused.

Laste kaariese markerid olid lähedased Eesti keskmistele väärtustele Olaki doktoritöös (Olak *et al.*, 2007), kus oli uuritud 472 2 kuni 4 aastast last ning laste keskmiseks dmft indeksiks oli 1,6 \pm 2,5. Need lapsed, kes sattusid juhuslikult eelnevast valimist käesoleva töö

uurimisgruppi, omasid veidi väiksemat dmfi taset ($0,46 \pm 0,83$). Sarnaseid tulemusi on täheldatud ka teistes riikides tehtud uuringutes (Bourgeois & Llodra, 2014). Laste dmfi indeks, meie uurimuses, võrreldes kahte MS liigi doonoreid eraldi, oli *S. mutans* tüvede puhul $0,62 \pm 0,96$ ja *S. sobrinus* tüvede puhul $0,27 \pm 0,65$. Antud uurimistöö laste SM skoor ($1,46 \pm 1,22$) on samuti lähedane keskmistele väärtustele võrreldes teiste riikidega (Fan *et al.*, 2019; Jeevarathan *et al.*, 2007).

Täiskasvanutel olid DMFT tulemused samas vanusegrupis sarnased üle maailma läbi viidud uuringutega (Lukacs, 2011; Pieralisse *et al.*, 2013). Kui võrrelda kahte erinevat uuritud MS liiki, siis neid omavate inimeste DMFT taseme vahel puudus oluline statistiline erinevus, kuid ilmselt seetõttu, et valim oli liiga väike või nii *S. mutans* kui *S. sobrinus* põhjustavad samal tasemel kaariest (vastavalt $11,25 \pm 6,3$ ja $10,17 \pm 3,6$). Paljudes uuringutes (Hata *et al.*, 2006; Hirose *et al.*, 1993; Okada *et al.*, 2005) on leitud, et kui mõlemad liigid esinevad koos, on ka kaariese tase kõrgem. Käesolevas uurimistöös emade SM tase oli $2,23 \pm 0,93$, mis on üsna kõrge. Näiteks Pannu *et al.* (2013) uurimuses leiti 200 India naise keskmiseks SM väärtuseks $1,65 \pm 0,93$.

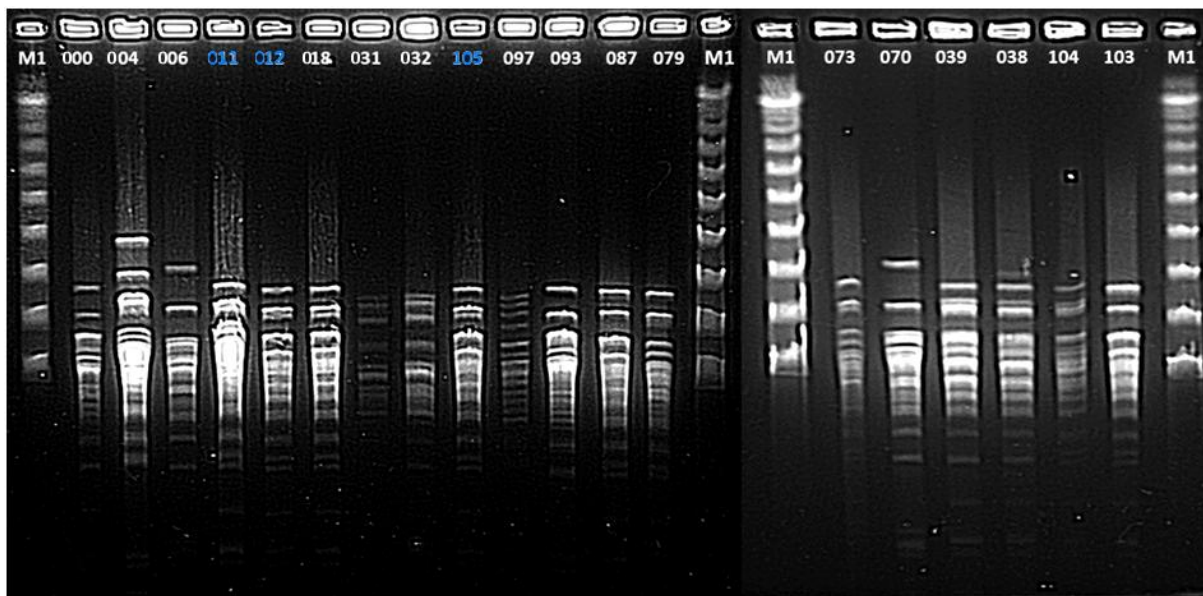
2.3.2 Tüvede genotüpiseerimine

Et kindlaks teha, kas kõik uurimuses analüüsitud mutans-streptokokkide tüved on erinevad, viidi läbi genotüpiseerimine pulssvälja geelelektroforeesi abil (Joonised 4 ja 5, ptk 2.2.7). Lisaks vajab kontrollimist, kas mõni tüvi on emalt lapsele kandunud, kuna ema võib osutada esmaseks nakkusallikaks. Tulemuste analüüsist selgus, et valimis oli 3 ema-laps paari, kelle hulgas genotüpiseerimise käigus leiti üks paar, kus emal ja lapsel esines samasuguse geenimustriga *S. sobrinus*. Sarnase geenimustriga tüve omanud ema ja laps omasid mõlemad SM skoori 2.

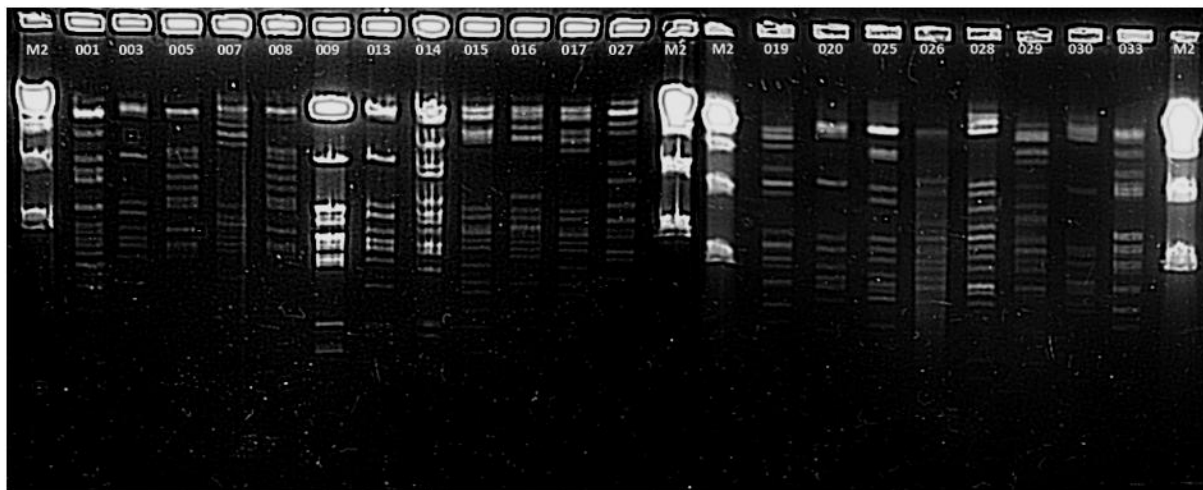
Joonisel 4 on sinisega märgitud ema ja lapse sarnase geenimustriga tüved (lapse 011 – HUMB_13011, 012 – HUMB_13012 ja ema 105 – HUMB_13105). Eelmiste tüvedega on sarnane ka tüvi 018, kuid tüvi on isoleeritud teiselt indiviidilt. Tüved 038 ja 039 on isoleeritud samast kaariesekoldest ja sama geenimustriga. Eelnevate tüvede geenimustrile on sarnane ka tüvi 104, kuid tegu on samuti teiselt indiviidilt isoleeritud tüvega.

Valitud tüvede hulgas oli kolm paari bakteritüvesid, mis pärinesid samalt indiviidilt. Kuna kaks tüvede paari olid ka sarnase geenimustriga, siis kaks korduvtüve eemaldati edasisest analüüsist (Tabel 4). Kolmandalt inimeselt eraldati 2 erineva geenimustriga *S. sobrinus*'e

tüve, seetõttu mõlemad tüved kaasati analüüsi. Seega kaasati uuringusse 37 inimese informatsioon, kuid 38 bakteritüve.



Joonis 4. Genotüpiseeritud *Streptococcus sobrinus*'e tüved, restriksioon *SmaI* ensüümiga; M1 – Lambda PFG ladder (Bio-Rad Laboratories, USA); kõik tüved on tähistatud nende HUMB koodist tuleneva kolme viimase numbriga. Sinisega märgitud ema ja lapse sarnase geenimustriga tüved.



Joonis 5. Genotüpiseeritud *Streptococcus mutans*'i tüved, restriksioon *ApaI* ensüümiga; M2 – Lambda PFG ladder (Bio-Rad Laboratories, USA); kõik tüved on tähistatud nende HUMB koodist tuleneva kolme viimase numbriga.

2.3.3 Virulentsusega seotud geenide esinemine mutans-steptokokkidel

Järgmisena vaadati uuritud MS tüvedel virulentsusgeenide esinemist ning võrreldi saadud informatsiooni varasemate uuringutega. Saadud info koguti, et analüüsida tulemusi

bakteritüvede doonorite kliiniliste parameetritega ning selgitada välja, kas uuritud virulentsusgeenid võivad põhjustada suuremat kariogeensust.

Joonis 6 illustreerib ühe tüve virulentsusgeenide esinemise detekteerimist elektroforeesigeeli pildi abil (*S. mutans* tüve HUMB_13003 abil).



Joonis 6. Geenide esinemine *S. mutans*'i tüvel HUMB_13003. DNA markerid: M1 – GeneRuler 100bp DNA Ladder (Thermo Scientific, USA); M2 – MassRuler™ Low Range DNA Ladder (Fermentas, USA).

Tabelis 4 on esitatud uuritud MS tüved, nende liik ja leitud virulentsusgeenid. Samuti sisaldab tabel tüvede varasemal mass-spektromeetrilisel samastamisel saadud Maldi-TOF skooride. Nende skooride alusel on kõik uuritud tüved usaldusväärselt samastatud.

Antud uurimistöö käigus saadud virulentsusgeenide detekteerimistulemused on toodud Tabelis 5, kus on esitatud *S. mutans*'i ja *S. sobrinus*'e virulentsusgeenide jaotus kahe liigi vahel.

Tabel 4. Virulentsusgeenide esinemine *S. mutans*'i ja *S. sobrinus*'e tüvedel

Tüve number	Tüve doonor	Liik	Maldi-TOF skoor	gbpA	gbpB	spaP	wapA	ffj	gtfB	gtfD	vicR	smu.1037c	smu.104	smu.105
13000	laps	<i>S. sobrinus</i>	2,188	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
13001	laps	<i>S. mutans</i>	2,128	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13002	laps	<i>S. mutans</i>	2,243	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13003	laps	<i>S. mutans</i>	2,208	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13004	laps	<i>S. sobrinus</i>	2,061	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
13005	laps	<i>S. mutans</i>	2,267	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13006	laps	<i>S. sobrinus</i>	2,084	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-	+
13007	laps	<i>S. mutans</i>	2,009	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13008	laps	<i>S. mutans</i>	2,148	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
13009	laps	<i>S. mutans</i>	2,149	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13011*	laps	<i>S. sobrinus</i>	1,949	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
13012*	laps	<i>S. sobrinus</i>	2,096	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
13013	laps	<i>S. mutans</i>	2,077	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13014	laps	<i>S. mutans</i>	2,245	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
13015	laps	<i>S. mutans</i>	2,1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13016	laps	<i>S. mutans</i>	2,004	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13017	laps	<i>S. mutans</i>	2,12	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
13018	laps	<i>S. sobrinus</i>	2,037	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+
13019	laps	<i>S. mutans</i>	1,928	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13020	ema	<i>S. mutans</i>	2,023	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13025	ema	<i>S. mutans</i>	2,123	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13026	ema	<i>S. mutans</i>	2,128	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13027	ema	<i>S. mutans</i>	2,175	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
13028	ema	<i>S. mutans</i>	2,141	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+
13029	ema	<i>S. mutans</i>	2,049	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13030	ema	<i>S. mutans</i>	2,023	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13031	ema	<i>S. sobrinus</i>	1,891	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
13032	ema	<i>S. sobrinus</i>	1,945	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	+
13033	ema	<i>S. mutans</i>	2,3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
13038*	ema	<i>S. sobrinus</i>	2,315	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
13039*	ema	<i>S. sobrinus</i>	2,028	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	-
13070	laps	<i>S. sobrinus</i>	1,967	+	+	-	+	+	+	-	-	-	-	+
13073	laps	<i>S. sobrinus</i>	1,871	+	+	-	+	+	-	-	+	+	-	+
13079	laps	<i>S. sobrinus</i>	1,885	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
13087	laps	<i>S. sobrinus</i>	2,138	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
13093	laps	<i>S. sobrinus</i>	2,079	+	+	+	+	+	+	-	-	+	-	-
13097	laps	<i>S. sobrinus</i>	2,134	+	+	-	+	+	+	-	-	+	-	+
13103	ema	<i>S. sobrinus</i>	1,978	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+
13104	ema	<i>S. sobrinus</i>	2,156	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	+
13105	ema	<i>S. sobrinus</i>	2,025	+	+	-	+	+	+	-	+	+	-	+

* samadelt individuidelt pärinevad sarnase geenimustriga tüved, mistõttu HUMB_13011 ja HUMB_13038 eemaldati järgnevast analüüsist; + olemasolevad geenid; - puuduvad geenid

Tabel 5. Virulentsusgeenide jaotus kahe MS liigi vahel

GEEN	mitmel % isolaatides vastav geen esines		p-väärtus* < 0,05
	<i>S. mutans</i> (n = 21)	<i>S. sobrinus</i> (n = 17)	
<i>gbpA</i>	100	100	NS
<i>gbpB</i>	95	100	NS
<i>spaP</i>	100	41	< 0,01
<i>wapA</i>	100	100	NS
<i>ftf</i>	100	100	NS
<i>gtfB</i>	100	82	< 0,05
<i>gtfD</i>	100	0	< 0,01
<i>vicR</i>	100	53	< 0,01
<i>smu.1037c</i>	100	88	NS
<i>smu.104</i>	76	0	< 0,01
<i>smu.105</i>	100	88	NS

*Pearson chi-square test; NS – mitte oluline (*not significant*)

Adhesiooni eest on vastutavad geenid *gbpA*, *gbpB* ja *spaP*. Biokile moodustamises osalevad *wapA* ja *vicR* ning biokile jaoks vajalikke polüsahhariide aitavad toota *ftf*, *gtfB* ja *gtfD*. *SMU.104* ja *SMU.105* lõhustavad süsivesikuid, mille käigus toodavad happed ning hapete talumisele aitab kaasa *SMU.1037c*.

Streptococcus mutans'i enamikul tüvedel olid olemas kõik uuritud virulentsusgeenid, nii hädavajalikud kui virulentsust suurendavad. Vaid hapete tootmisega seotud *SMU.104* geen puudus veerandil selle liigi tüvedel (Tabel 5). *SMU.104* kodeerib valku α -glükosidaasi glükosüülhüdrolaas, mille bioloogiline roll on osaleda süsivesikute ainevahetusprotsessis ning molekulaarne funktsioon on seotud glükosüülsidemete hüdrolüüsimisega. Toidust saadakse sahharoosi (disahhariid), seal olev side on vaja lõhkuda ning *SMU.104* poolt toodetud hüdrolaasi abil hüdrolüüsitakse sahharoos glükoosiks ja fruktoosiks (EMBL-EBI).

Seevastu *S. sobrinus*'e tüvedel olid mitmed uuritud virulentsusgeenid oluliselt harvemini esindatud (Tabel 5). Kõigis tüvedes olid olemas *gbpA*, *gbpB*, *wapA* ja *ftf* geenid, samas geenid *spaP*, *gtfB*, *vicR*, *SMU.1037c* ja *SMU.105* olid olemas 41–88% *S. sobrinus*'e tüvedes. Geene *gtfD* ja *SMU.104* ei leitud ühelgi *S. sobrinus*'e tüvel. Statistiliselt oluline erinevus kahe *Streptococcus* liigi vahel oli geenide *spaP*, *vicR*, *gtfD* ja *SMU.104* osas ($p < 0,01$) (Tabel 5).

Suurem osa varasemalt tehtud uurimustöödest kajastab enamasti *S. mutans*'i virulentsusfaktoreid, *S. sobrinus*'e virulentsusfaktoreid on oluliselt vähem uuritud. Seetõttu on

võrdlusmaterjali vähem kui *S. mutans*'i kohta. Sellest tulenevalt ei saa käesolevas töös kindlalt järeldada, et kui geeniprodukt puudub, kas see tuleneb sellest, et sellel liigil seda geeni ei esine või puudub see geen valitud tüvel. Lisaks tuleb arvestada, et mõlema liigi puhul oli uurimisgrupp väike, mis võib tulemusi mõjutada.

Varasemad uuringud on siiski näidanud, et *S. mutans* ja *S. sobrinus* erinevad veidi üksteisest virulentsusfaktorite poolest. Näiteks on leitud de Soet *et al.* (1991) ja Igarashi *et al.* (2000) uurimustes, et *S. sobrinus*'el on suurem happe tootmise võimekus kui *S. mutans*'il. Samuti on *S. sobrinus*'elt avastatud suuremal hulgal GTFe (Conrads *et al.*, 2014; Igarashi *et al.*, 2000). Conrads *et al.* (2014) töös näidati nii *S. mutans*'is kui ka *S. sobrinus*'es *gbpA*, *gbpB*, *gtfB*, *gtfD*, *spaP* ja *vicR* geenide olemasolu. Vaid *SMU.1037c* geeni ei esinenud Conrads *et al.* (2014) töös uuritud *S. sobrinus*'es, mis *S. mutans*'is leiti. MSides on näidatud ka *ftf* ja *wapA* geenide olemasolu (Argimón & Caufield, 2011; Rozen *et al.*, 2001; Shemesh & Steinberg, 2006; Zhu *et al.*, 2006) ning need geenid esinesid ka kõikides käesolevas uurimistöös uuritud tüvedes.

Meie uurimistööst selgub, et enamikel *S. mutans*'i tüvedel esinesid uuritud virulentsusgeenid, mis on seotud nii biokile moodustamise, adhesiooni, happe produktsiooni ja tolerantsuse kui ka keskkonnaga suhtlemisega. Vaid *SMU.104* geeni ei esinenud kõikides tüvedes. Seevastu *S. sobrinus*'e tüvedes esinesid uuritud virulentsusgeenid võrreldes *S. mutans*'iga harvemini (*spaP*, *vicR*, *gtfD* ja *SMU.104* $p < 0,01$ ning *gtfB* $p < 0,05$). Lisaks esines seos *gtfD* ja *vicR* geenide esinemise vahel ($r_s = 0,574$; $p < 0,01$), *vicR* ja *gtfB* vahel ($r_s = 0,328$; $p < 0,05$) ning *gtfD* ja *gtfB* vahel ($r_s = 0,325$; $p < 0,05$).

Kui valimis olevaid geene bakteris välja lülitada, muutub *S. mutans*'i virulentsus. Antud tüvi pole siis enam keskkonnatingimustele nii vastupidav, kuna toimuvad muutused, kas biokile moodustumisel ja struktuuris (Matsumi *et al.*, 2015; Lynch *et al.*, 2013; Zhu *et al.*, 2006), adhesioonis hambapinnale (Hazlett *et al.*, 1999; Jenkinson & Demuth, 1997; Rozen *et al.*, 2004) või EPSi tootmise vähenemisel (Shellis & Dibdin, 1988; Yamashita *et al.*, 1993). Kõikidel leitud geenidel on mikroorganismis olulised rollid, kuid on avastatud, et *vicR* geen on *S. mutans*'i eluspüsimisel hädavajalik.

Vic geenid reguleerivad mitmeid teisi virulentsusega seotud geenide ekspressiooni (*gtfB*, *gtfC*, *gtfD*, *ftf* ja *gbpB*), toimides nende promootorpiirkondadele. *vicR* nullmutatsioon on *S. mutans*'ile ilmselt surmav (Senadheera *et al.*, 2005) ning seetõttu esineb ta ka kõikides uuritud tüvedes. Zhuang *et al.* (2018) uurimuses isoleeriti ja puhastati nii kaariest omavatel

kui kaariesevabadel lastel *S. mutans*'itest 121 *vicR* geeni ning leiti, et see oli kõikides isolaatides konserveerunud.

Kuigi *vicR*'i puhul on leitud, et see on *S. mutans*'i jaoks hädavajalik, ei pruugi see nii olla *S. sobrinus*'es. On täheldatud, et erinevates streptokoki liikides erineb selle geeni tähtsus, kuid põhjus pole veel selgelt teada (Mattos-Graner & Duncan, 2017; Senadheera *et al.*, 2005). Ilmselt seetõttu võis käesolevas magistritöös uuritud *S. sobrinus*'e tüvedel 47%-l puududa *vicR* geen.

Samas on teada, et VicRK signaaliülekanne süsteem mõjutab GTFide ekspressiooni. Kui *S. mutans*'ite mutantsetes tüvedes puudus *vicRK* süsteem, täheldati *gtfD* geeni ekspressiooni langust ning *gtfB* geeni ekspressiooni suurenemist (Krzyściak *et al.*, 2014; Senadheera *et al.*, 2005). Meie uurimustöös ei uuritud ekspressioonitaset, kuid nähti korrelatsiooni *vicR* ja *gtfD* geeni esinemise vahel ($r_s = 0,574$; $p < 0,01$), millest viimane puudus tüvedelt, kus ka *vicR* geen puudus. Seevastu geen *gtfB* oli teatud juhtudel olemas tüvedel, millel olid puudu *vicR* või *gtfD* geen (*vicR* ja *gtfB* $r_s = 0,328$; $p < 0,05$ ning *gtfD* ja *gtfB* $r_s = 0,325$; $p < 0,05$).

Eelnevate uurimistööde (Conrads *et al.*, 2014; Igarashi *et al.*, 2000) põhjal on leitud, et *S. sobrinus*'el esineb rohkesti GTFe tootvaid geene, millest oluliseim on *gtfB*. Antud geen leidis ka magistritöös uuritud *S. sobrinus*'e 17-st tüvest 82%-l. Lisaks puudus neil täielikult *gtfD* geen. See võib olla seotud asjaoluga, et kuna *S. sobrinus* omab suuremal hulgal GTF'e tootvaid geene, siis teised geenid, mida selles töös ei uuritud, kompenseerivad erinevate glükotransferaaside tootmise.

S. sobrinus'el detekteeriti võrreldes *S. mutans*'iga palju väiksemal määral *spaP* geeni produkti ($p < 0,01$). *spaP* on bakterile oluline ning suurendab virulentsust, kuid selle funktsioon ja osakaal võib streptokokkide erinevates liikides varieeruda (Crowley *et al.*, 1999; Jenkinson & Demuth, 1997).

Geen *SMU.1037c* leiti 88% *S. sobrinus*'e tüvedest ning antud geen aitab kaasa bakteri kohanemisele muutuvate keskkonna tingimustega. Conrads *et al.* (2014) uuringus täheldati, et *S. sobrinus*'es puudus *SMU.1037c* ja TCS-7 süsteem, aga samas oli võrreldud vaid kahte *S. sobrinus*'e tüve.

Geenid *SMU.104* ja *SMU.105* ei ole ilmtingimata bakterile vajalikud, aga võivad suurendada konkurentsi eelist teiste tüvede ees, kuna aitavad kaasa kiiremale happe produktsioonile, kuid nagu Banas (2004) uurimuses leiti, on hapete tootmine erinevates mutans-streptokokkide

tüvedes varieeruv. Käesolevas uurimistöös leiti, et kõikides *S. mutans*'ites esines *SMU.105* geen, seevastu *S. sobrinus*'es aga 88%. Geen *SMU.104* puudus veerandil *S. mutans*'i tüvedel. Kuna *SMU.104* geeni ei täheldatud *S. sobrinus*'e tüvedel isegi temperatuuri gradiendiga testitud PCR produktides, siis võib järeldada, et *S. sobrinus*'tel uuritud geen puudub. Samas on varasemates uuringutes täheldatud (Igarashi *et al.*, 2000; de Soet *et al.*, 1991), et *S. sobrinus*'e happe produktsiooni võimekus on suurem, aga selle taga võivad olla teised geenid, mida käesolevas töös ei uuritud.

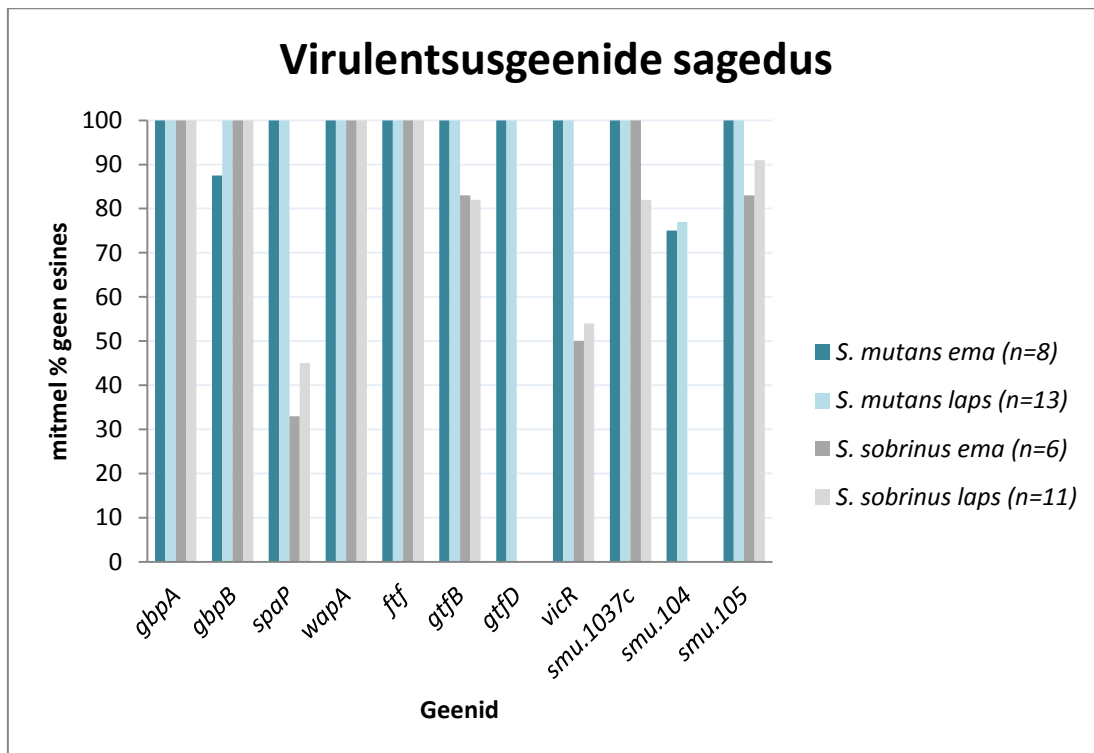
S. mutans'i ja *S. sobrinus*'e tüvedel võivad olla erinevad taju- ja reageerimismehhanismid ning kuna nad esinevad tihti sümbiontselt biokiles koos, ei pruugi *S. sobrinus*'el olla vajadust kõiki geene omada. Sellest võib tuleneda ka puuduolevate geenide rohkus. Kuigi uurimistöösse valitud geenid on olulised virulentsuse tekkes, ei määratud töös kõiki virulentsuseks vajalikke geene. Võimalik on, et MS liigid omavad veel virulentsemaid geene, mis jäid kahjuks kajastamata.

Meie uuringud kinnitasid, et *Streptococcus* liikide virulentsusfaktorite vahel on tõepoolest erinevused, kuid tõestust ei leidnud fakt, et *S. sobrinus*'el oleks esinenud suurem hulk GTFe või happeid tootvaid geene võrreldes *S. mutans*'itega.

2.3.4 Virulentsusega seotud geenide esinemine emadel ja lastel

Täpsustavalt vaadati, kas laste ja vanemate MSide virulentsusgeenide esinemise vahel on erinevusi. Joonisel 7 on toodud kokkuvõtte *S. mutans*'i ja *S. sobrinus*'e virulentsusgeenidest emadel ja lastel. Uuritud lastel esines võrreldes emadega *S. sobrinus*'e tüvedes rohkem *spaP*, *vicR* ja *SMU.105* geene, kuid vahe pole statistiliselt oluline. Emadel aga tuvastati vastupidiselt geen *SMU.1037c* veidi suuremal hulgal. Ülejäänud geenide esinemine oli liigiti sarnane.

Kuna ema-laps paare oli vaid üks, on see liiga väike valim, et ema-laps ülekannet (transmissiooni) analüüsida. Klein *et al.* (2004) uurimuses leiti 83% identseid või väga lähedasi MS isolaate ema-lapse paarides, millest võib järeldada, et tüvedes on geenide esinemises sarnasus. Ilmselt võib see olla nii ka üleüldiselt MS liikides, kuna uuritud geenid on olulised MS eluks ja virulentsuse tekkeks. Lisaks on varasemates uuringutes täheldatud, et kõik identsete *S. mutans*'i tüvedega ema-laps paaride sarnased bakteritüved ei pruugi omada sarnast virulentsust kaariese tekkel (Ravikumar *et al.*, 2018). Leitud on, et isegi kui emal ja lapsel esineb sarnane tüvi, sõltub kaariese teke ning tüve iseloom suuresti riskifaktoritest (suhkru tarbimine, imetamise kestus, hambapesu jms) (Harris *et al.*, 2004).



Joonis 7. Virulentsusgeenide esinemissagedus kahe MS liigi ning emade ja laste vahel

2.3.5 Seos kliiniliste parameetrite ja geenide vahel

Et tuvastada, kas valitud virulentsusgeenid võivad suurendada bakterite kariogeensust, hinnati korrelatsioonanalüüsi abil seoseid kaariesemarkerite ja tüvede geneetilise informatsiooni vahel. Kuna *S. sobrinus*'e kohta on tehtud vähe uuringuid, mis kajastavad geneetilise info ja kliiniliste parameetrite seoseid ning *S. mutans* ja *S. sobrinus* on lähedased liigid, siis kasutati *S. sobrinus*'e tüvede võrdlusmaterjalina ka *S. mutans*'i tüvesid käsitletud uuringuid.

Tabelites 6 ja 7 on esitatud korrelatsioonid SM skoori ja virulentsusgeenide vahel, nii MSidel koos kui ka kahel liigil eraldi. Kui vaatasime kogu gruppi koos (Tabel 6), siis *S. mutans*'i tüvedes esinevate virulentsusgeenide ning SM skoori vahel puudus statistiliselt oluline seos, kuid veidi tugevam korrelatsioon ($p = 0,108$) esines *S. sobrinus*'e tüvedes esinenud *spaP* geeni ja SM skoori vahel. Kui me vaatasime emasid ja lapsi eraldi (Tabel 7), siis leidsime sama geeni ja SM skoori vahel statistiliselt olulise positiivse seose laste puhul ($r_s = 0,643$, $p = 0,033$).

Tabel 6. Korrelatsioonid erinevate bakteriliikide virulentsusgeenide ja SM skoori vahel. Iga inimese SM skoori taset (0–3) on võrreldud temalt leitud bakteritüves esinenud/puudunud konkreetse geeniga. Näidatud on korrelatsioonanalüüsi tulemused kõikidelt doonoritelt saadud tüvede geenide ning SM skoori vahel kahel liigil koos ja liikidel eraldi.

GEEN	Erinevate liikide geenide korrelatsioon SM skooriga					
	<i>S. mutans</i> & <i>S. sobrinus</i> (n = 38)		<i>S. mutans</i> (n = 21)		<i>S. sobrinus</i> (n = 17)	
	r_s	p-väärtus	r_s	p-väärtus	r_s	p-väärtus
<i>gbpA</i>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>gbpB</i>	0	NS (1)	-0,057	NS (0,805)	n/a	n/a
<i>spaP</i>	0,117	NS (0,796)	n/a	n/a	0,404	NS (0,108)
<i>wapA</i>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>ftf</i>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>gtfB</i>	0,019	NS (0,912)	n/a	n/a	0,101	NS (0,699)
<i>gtfD</i>	-0,149	NS (0,372)	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>vicR</i>	-0,295	NS (0,072)	n/a	n/a	-0,398	NS (0,113)
<i>smu.1037c</i>	0,023	NS (0,894)	n/a	n/a	0,059	NS (0,819)
<i>smu.104</i>	-0,163	NS (0,329)	-0,095	NS (0,681)	n/a	n/a
<i>smu.105</i>	-0,281	NS (0,088)	n/a	n/a	-0,398	NS (0,114)

Spearsman's r_s korrelatsioon; SM – *Strip mutans* (Orion Diagnostica); n/a – tulemus puudub (*no answer*); NS – mitte oluline (*not significant*)

Tabel 7. Korrelatsioonid *S. sobrinus*'e virulentsusgeenide ja SM skoori vahel lastel ja emadel. Võrreldud on iga inimese, kelle hambakatust on eraldatud *S. sobrinus*, SM skoori taset (0–3) temalt leitud *S. sobrinus*'e tüves esinenud/puudunud konkreetse geeniga. Näidatud on korrelatsioonanalüüsi tulemused doonoritelt saadud *S. sobrinus*'e tüvede ja nendes esinevate geenide ning SM skoori vahel lastel ja emadel eraldi. Sinise kirjaga on tähistatud tulemused, mis näitasid statistiliselt olulist positiivset korrelatsiooni ($p < 0,05$).

GEEN	<i>S. sobrinus</i> 'e virulentsusgeenide korrelatsioon SM skooriga			
	lapsed (n = 11)		emad (n = 6)	
	r_s	p-väärtus	r_s	p-väärtus
<i>gbpA</i>	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>gbpB</i>	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>spaP</i>	0,643	p = 0,033	0	NS (1)
<i>wapA</i>	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>ftf</i>	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>gtfB</i>	0	NS (1)	0,447	NS (0,374)
<i>gtfD</i>	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>vicR</i>	-0,428	NS (0,189)	-0,333	NS (0,512)
<i>smu.1037c</i>	0	NS (1)	n/a	n/a
<i>smu.104</i>	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>smu.105</i>	-0,371	NS (0,262)	-0,447	NS (0,374)

Spearsman's r_s korrelatsioon; SM skoor – *Strip mutans* (Orion Diagnostica); n/a – tulemus puudub (*no answer*); NS – mitte oluline (*not significant*)

See tähendab, et lapsed, kelle *S. sobrinus*'e tüvedes esines *spaP* geen, omasid suuremat SM skoori taset, kui lapsed, kelle *S. sobrinus*'e tüvedes see geen puudus. See võib olla eelduseks, et nendel lastel võiks edaspidi kariogeensus suurened. Kuna *spaP* vastutab adhesiooni eest, võivad selle geeniga bakterid omada paremat kinnitumisvõimet hambale ning kokkuvõttes koloniseerida hambapinda paremini. See annab neile paljunemise eelise, mille tagajärjel nende hulk inimese suus tõuseb, mis võib omakorda olla seotud kariogeensususe tõusuga.

Tabelites 8 ja 9 on esitatud korrelatsioonid virulentsusgeenide ja DMFT/dmf indeksi vahel. Tabelis 8 on näidatud ema DMFT indeksi seosed iga virulentsusgeeniga nii *S. mutans*'i ja *S. sobrinus*'e liikidel koos kui ka eraldi. Tabelis 9 on näidatud sarnase analüüsi tulemused laste dmf indeksiga. Leitud seosed ei olnud statistiliselt olulised, kuid tuleb arvestada, et uuritud grupid ega tüvede arv ei olnud suur ning doonorite grupid olid heterogeensed. Lisaks võis ühel inimesel esineda suus nii *S. mutans* kui ka *S. sobrinus*. On leitud, et koos elades suurendavad nad kariogeensusust (Hata *et al.*, 2006; Hirose *et al.*, 1993; Okada *et al.*, 2005; Saraithong *et al.*, 2015), kuid valimis polnud indiviide, kellel oleks olnud eraldatud ühest kaariesekoldest mitut erinevat liiki.

Tabel 8. Korrelatsioonid erinevate bakteriliikide virulentsusgeenide ja emade DMFT indeksi vahel. Iga ema DMFT taset (0–32) on võrreldud temalt leitud bakteritüves esinenud/puudunud konkreetse geeniga. Näidatud on korrelatsioonanalüüsi tulemused doonoritelt saadud tüvede virulentsusgeenide ning DMFT skoori vahel kahel liigil koos ja liikidel eraldi.

GEEN	Erinevate liikide geenide korrelatsioon DMFT skooriga					
	<i>S. mutans</i> & <i>S. sobrinus</i> (n = 14)		<i>S. mutans</i> (n = 8)		<i>S. sobrinus</i> (n = 6)	
	r _s	p-väärtus	r _s	p-väärtus	r _s	p-väärtus
<i>gbpA</i>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>gbpB</i>	-0,313	NS (0,276)	-0,417	NS (0,304)	n/a	n/a
<i>spaP</i>	-0,198	NS (0,497)	n/a	n/a	-0,533	NS (0,276)
<i>wapA</i>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>ftf</i>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>gtfB</i>	0,035	NS (0,906)	n/a	n/a	0,135	NS (0,799)
<i>gtfD</i>	0	NS (1)	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>vicR</i>	0,197	NS (0,501)	n/a	n/a	0,402	NS (0,429)
<i>smu.1037c</i>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>smu.104</i>	0	NS (1)	0	NS (1)	n/a	n/a
<i>smu.105</i>	-0,035	NS (0,906)	n/a	n/a	-0,135	NS (0,799)

Spearsman's r_s korrelatsioon; DMFT – *decayed/missing/filled teeth*; n/a – tulemus puudub (*no answer*); NS – mitte oluline (*not significant*)

Tabel 9. Korrelatsioonid erinevate bakteriliikide virulentsusgeenide ja laste dmfi indeksi vahel. Iga lapse dmfi taset (0–20) on võrreldud temalt leitud bakteritüves esinenud/puudunud konkreetse geeniga. Näidatud on korrelatsioonanalüüsi tulemused doonoritelt saadud tüvede virulentsusgeenide ning dmfi skoori vahel kahel liigil koos ja liikidel eraldi.

GEEN	Erinevate liikide geenide korrelatsioon dmfi skooriga					
	<i>S. mutans</i> & <i>S. sobrinus</i> (<i>n</i> = 24)		<i>S. mutans</i> (<i>n</i> = 13)		<i>S. sobrinus</i> (<i>n</i> = 11)	
	<i>r_s</i>	p-väärtus	<i>r_s</i>	p-väärtus	<i>r_s</i>	p-väärtus
<i>gbpA</i>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>gbpB</i>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>spaP</i>	0,157	NS (0,465)	n/a	n/a	0,086	NS (0,802)
<i>wapA</i>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>ftf</i>	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>gtfB</i>	0,173	NS (0,419)	n/a	n/a	0,221	NS (0,514)
<i>gtfD</i>	0,176	NS (0,411)	n/a	n/a	n/a	n/a
<i>vicR</i>	0,108	NS (0,616)	n/a	n/a	0	NS (1)
<i>smu.1037c</i>	-0,101	NS (0,639)	n/a	n/a	-0,332	NS (0,319)
<i>smu.104</i>	0,121	NS (0,572)	-0,03	NS (0,921)	n/a	n/a
<i>smu.105</i>	0,118	NS (0,578)	n/a	n/a	0,148	NS (0,664)

Spearman's *r_s* korrelatsioon; dmfi – *decayed/missing/filled*; n/a – tulemus puudub (*no answer*); NS – mitte oluline (*not significant*)

Sarnane tulemus saadi ka varasemas uuringus (Argimón & Caufield, 2011), kus uuriti osaliselt samu geene, mida ka käesolevas töös (*gbpA*, *gbpB*, *spaP*, *wapA*, *ftf* ja *gtfB*) ning kus ei leitud seost kaariesevabadel ning kaariesega indiviididel.

Seevastu Durán-Contreras *et al.* (2011) 12–46-kuuste laste uuring näitas, et *spaP* geenil ja kariogeensuse vahel esineb seos. *S. mutans*'i tüved, mis omasid *spaP* geeni, tekitasid kõrgemat dmfi skoori. Pieralisse *et al.* (2013) uuringus võrreldi samuti *spaP* geeni esinemist ning leiti, et emadel puudus seos uuritava geeni esinemise ja DMFT taseme vahel, kuid lastel oli seos olemas (*p* = 0,03). Meie uuring näitas selle geeni seost kariogeensuse markeri, SM skooriga.

Seega on olemasolevad andmed MS virulentsusgeenide ja kliiniliste markerite seostest vastukäivad ning probleem vajab jätkuvalt uuringuid.

Kokkuvõte

Hambakaaries on väga levinud bakteriaalne, ebamugavusi tekitav ning tervishoiusüsteemi koormav haigus. Et kaariese levimust vähendada, on vaja hästi tunda kaariesebakterite virulentsust põhjustavaid geene, et välja arendada efektiivsemaid profülaktikameetmeid. Seetõttu seati käesoleva uurimistöö eesmärgiks välja selgitada kaariest tekitavate mutansstreptokokkide (*S. mutans*, *S. sobrinus*) virulentsusfaktorid ja võrrelda saadud geneetilist infot kirjanduse andmetega ning eelnevalt kogutud kliiniliste andmetega, et hinnata võimalikke erinevusi kahe bakteriliigi kariogeensuses.

Käesolevasse töösse valiti 40 mutans-streptokokkide tüve, millest 21 kuulusid liiki *Streptococcus mutans* ja 19 kuulusid liiki *Streptococcus sobrinus*. Tüvede doonoriteks olid kaariesega emad ja lapsed. Edasisteks uuringuteks valiti välja 11 virulentsusgeeni (*gbpA*, *gbpB*, *spaP*, *wapA*, *ftf*, *gtfB*, *gtfD*, *vicR*, *SMU.1037c*, *SMU.104* ja *SMU.105*), mis kajastasid põhilisi virulentsusklasse. Uuritud bakteritüved olid eraldatud varasema uuringu käigus ning iga doonori kohta oli kogutud kliiniline informatsioon (dmf ja DMFT indeks, SM skoor), mida võrreldi bakterite uurimise käigus saadud geneetilise infoga.

Magistritöö tulemusena leidis kinnitust, et mutans-streptokokkide kahe liigi virulentsusfaktorite vahel on tõepoolest erinevused. Uuring näitas, et enamikel *S. mutans*'i tüvedel esinesid uuritud virulentsusgeenid, mis hõlmasid nii biokile moodustamist, adhesiooni, happe produktsiooni ja tolerantsust kui ka keskkonnaga suhtlemist. Vaid *SMU.104* geen puudus veerandil selle liigi tüvedel. Seevastu *S. sobrinus*'e tüvedel leiti mitmeid uuritud geene oluliselt vähem. Kõigis selle liigi tüvedes olid olemas geenid *gbpA*, *gbpB*, *wapA* ja *ftf*. Geenid *spaP*, *gtfB*, *vicR*, *SMU.1037c* ja *SMU.105* esinesid 41–88% *S. sobrinus*'e tüvedes ning geene *gtfD* ja *SMU.104* ei leitud ühelgi uuritud *S. sobrinus*'e tüvel.

Selle uurimistöö analüüs näitas ka laste *S. sobrinus*'e tüvedel positiivset seost *spaP* esinemise ja SM skoori tõusu vahel ($r_s = 0,643$, $p = 0,033$) ehk inimesed, kellel selle liigi tüvedes esines *spaP*, omasid suuremat SM skoori taset. Kuna *spaP* vastutab adhesiooni eest, võib saadud tulemus viidata, et bakterid, mis omavad *spaP* geeni, kinnituvad hambale paremini ning seeläbi tõstavad nad hambakatus SM taset. See võib olla omakorda seotud kariogeensuse tõusuga. Ülejäänud geenide ja kliiniliste parameetrite (dmf, DMFT ja SM) vahel seos puudus.

Uuringu valim oli suhteliselt väike, kuid selle töö oluline väärtus võrreldes teiste uurimistöödega seisnes selles, et analüüsiti oluliselt suuremal hulgal *S. sobrinus*'e tüvesid ($n =$

17, erinevalt varasematest paari tüve analüüsist). Valimisse kaasati võrdselt nii *S. mutans*'i kui ka *S. sobrinus*'e tüvesid. Selle tulemusel selgus, et eelnevalt *S. sobrinus*'es arvatavalt puuduolev *SMU.1037c* geen siiski esineb selle liigi tüvedes. Seda tööd saab kasutada võrdlusmaterjalina tulevastes uurimustes, mis käsitlevad *S. sobrinus*'e virulentsusfaktoreid.

Virulence factors of Mutans streptococci

Greete Maasi

Summary

The mouth is colonized by many different microorganisms, and pathological processes such as dental caries can occur when the microbiological balance is shifted. Dental caries is very common bacterial disease with multifactorial etiology, affecting about 70–80% of the world's population. Caries is associated with microbiological shifts and is caused by the interaction of biofilm-forming bacteria and the tooth surface. Its formation is also influenced by hygiene, including exposure to fluoride, diet, saliva flow and its ingredients, and genetic factors.

Mutans-streptococci are the group of bacteria that colonize the tooth surface and can cause tooth decay. This group includes *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus*. They have developed certain advantages over time, such as – virulence factors, which are the properties of a pathogen that can increase its ability to cause disease. In mouth and dental plaque, the environmental conditions are complex and constantly changing, which is why Mutans-streptococci are highly adaptable and their genes have a variation in virulence. Phenotypes differ in the formation of biofilm, the ability to adhere to tooth enamel, the production of polysaccharides, the rapid and high production of acids from carbohydrates and in the tolerance of low pH and oxidative stress.

The aim of this Master's thesis was to determine the profile of virulence factors in caries-causing Mutans-streptococci (*S. mutans*, *S. sobrinus*) and to compare the obtained genetic information with literature data and previously collected clinical data to assess possible differences in the cariogenicity of the two species. For the present study, 40 Mutans-streptococci strains were selected, of which 21 belonged to *Streptococcus mutans* and 19 belonged to *Streptococcus sobrinus*. The strains were collected from mothers and children. Eleven virulence genes (*gbpA*, *gbpB*, *spaP*, *wapA*, *ftf*, *gtfB*, *gtfD*, *vicR*, *SMU.1037c*, *SMU.104* and *SMU.105*) were selected for further studies, reflecting the main types of virulence. DNA was isolated from selected bacterial strains, PCR was performed, and its products were separated in a 1.2% agarose gel. The strains in our studies were isolated from a previous study and clinical information (dmf and DMFT index, SM score) was collected from each donor. In this thesis the collected data were compared with genetic information of the strains.

This Master's thesis confirmed that there are indeed differences between virulence factors. Study showed that most strains of *S. mutans* had the selected virulence genes, covering biofilm formation, adhesion, acid production and tolerance, as well as interaction with the environment. Only a quarter of the strains lacked the *SMU.104* gene. In contrast, *S. sobrinus* strains had significantly fewer of the genes. Only the genes *gbpA*, *gbpB*, *fff* and *wapA* were present in all strains and are associated with one of the most important virulence factor in Mutans-streptococci – adhesion.

Analysis showed a positive correlation between the presence of *spaP* in *S. sobrinus* and an increase in the SM score in children ($r_s = 0.643$, $p = 0.033$). Individuals who had *spaP* in their *S. sobrinus* strains had a higher level of SM score. As *spaP* is responsible for adhesion, the result may indicate that the bacteria carrying the *spaP* gene have better adhesion to the tooth. In this way, they increase the level of SM, so they are able to colonize the tooth surface better and then multiply and as a result the number of MS in mouth increases. This may be associated with an increase in cariogenicity. There was no association between other genes and clinical parameters (dmf, DMFT and SM).

The study was conducted in an important area of public health, and the information obtained in this study can be used by further studies where it is necessary to compare virulence genes in MS. Especially in *S. sobrinus*, because previously there were no experiments looking at the presence of those genes in that many strains in this bacterial species.

Tänuõnad

Täna suure abi ning toetuse eest oma juhendajaid – Reet Mändarit ja Merike Jõesaart, kes jagasid kasulikke nõuandeid, toetussõnu ja leidsid aega, et lahendada tekkinud küsimused, ning Jelena Štšepetovat, kes aitas läbi viia laboratoorseid tööd. Veel sooviksin tänada Tiiu Rööpi, kes aitas töötada tüvedega ning Jana Olakit, kelle doktoritöös kogutud informatsiooni põhjal valmis käesolev töö.

Kasutatud kirjandus

- Ajdic, D., and Chen, Z. (2013). A novel phosphotransferase system of *Streptococcus mutans* is responsible for transport of carbohydrates with α -1,3 linkage. *Mol. Oral Microbiol.* 28, 114–128.
- Ajdić, D., McShan, W.M., McLaughlin, R.E., Savić, G., Chang, J., Carson, M.B., Primeaux, C., Tian, R., Kenton, S., Jia, H., et al. (2002). Genome sequence of *Streptococcus mutans* UA159, a cariogenic dental pathogen. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 99, 14434–14439.
- de Almeida, P.D.V., Grégio, A.M.T., Machado, M.A.N., de Lima, A.A.S., and Azevedo, L.R. (2008). Saliva composition and functions: a comprehensive review. *J. Contemp. Dent. Pract.* 9, 72–80.
- Anderson, M. (2002). Risk assessment and epidemiology of dental caries: review of the literature. *Pediatr. Dent.* 24, 377–385.
- Argimón, S., and Caufield, P.W. (2011). Distribution of Putative Virulence Genes in *Streptococcus mutans* Strains Does Not Correlate with Caries Experience. *J. Clin. Microbiol.* 49, 984–992.
- Avila, M., Ojcius, D.M., and Yilmaz, Ö. (2009). The Oral Microbiota: Living with a Permanent Guest. *DNA Cell Biol.* 28, 405–411.
- Banas, J.A. (2004). Virulence properties of *Streptococcus mutans*. *Front. Biosci. J. Virtual Libr.* 9, 1267–1277.
- Banas, J.A., and Vickerman, M.M. (2003). Glucan-binding proteins of the oral streptococci. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.* 14, 89–99.
- Biswas, I., Drake, L., Erkina, D., and Biswas, S. (2008). Involvement of Sensor Kinases in the Stress Tolerance Response of *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 190, 68–77.
- Bourgeois, D.M., and Llodra, J.C. (2014). Global burden of dental condition among children in nine countries participating in an international oral health promotion programme, 2012–2013. *Int. Dent. J.* 64, 27–34.
- Bowden, G.H., and Hamilton, I.R. (1998). Survival of oral bacteria. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol.* 9, 54–85.
- Bradshaw, D.J., McKee, A.S., and Marsh, P.D. (1989). Effects of carbohydrate pulses and pH on population shifts within oral microbial communities in vitro. *J. Dent. Res.* 68, 1298–1302.
- Brady, L.J., Maddocks, S.E., Larson, M.R., Forsgren, N., Persson, K., Deivanayagam, C.C., and Jenkinson, H.F. (2010). The changing faces of *Streptococcus* antigen I/II polypeptide family adhesins. *Mol. Microbiol.* 77, 276–286.
- Broadbent, J.M., and Thomson, W.M. (2005). For debate: problems with the DMF index pertinent to dental caries data analysis. *Community Dent. Oral Epidemiol.* 33, 400–409.
- Brown, L.J., and Selwitz, R.H. (1995). The impact of recent changes in the epidemiology of dental caries on guidelines for the use of dental sealants. *J. Public Health Dent.* 55, 274–291.

- Burne, R.A. (1998). Oral Streptococci... Products of Their Environment. *J. Dent. Res.* 77, 445–452.
- Cappelli, D.P., and Mobley, C.C. (2008). Prevention in clinical oral health care. Mosby Elsevier.
- Chia, J.-S., Chang, L.Y., Shun, C.-T., Chang, Y.-Y., and Chen, J.-Y. (2001). A 60-Kilodalton Immunodominant Glycoprotein Is Essential for Cell Wall Integrity and the Maintenance of Cell Shape in *Streptococcus mutans*. *Infect. Immun.* 69, 6987–6998.
- Clarke, J.K. (1924). On the Bacterial Factor in the Etiology of Dental Caries. *Br. J. Exp. Pathol.* 5, 141–147.
- Conrads, G., de Soet, J.J., Song, L., Henne, K., Sztajer, H., Wagner-Döbler, I., and Zeng, A.-P. (2014). Comparing the cariogenic species *Streptococcus sobrinus* and *S. mutans* on whole genome level. *J. Oral Microbiol.* 6.
- Cornejo, O.E., Lefébure, T., Pavinski Bitar, P.D., Lang, P., Richards, V.P., Eilertson, K., Do, T., Beighton, D., Zeng, L., Ahn, S.-J., et al. (2013). Evolutionary and Population Genomics of the Cavity Causing Bacteria *Streptococcus mutans*. *Mol. Biol. Evol.* 30, 881–893.
- Costerton, J.W. (1999). Introduction to biofilm. *Int. J. Antimicrob. Agents* 11, 217–221.
- Crowley, P.J., Brady, L.J., Michalek, S.M., and Bleiweis, A.S. (1999). Virulence of a *spaP* Mutant of *Streptococcus mutans* in a Gnotobiotic Rat Model. *Infect. Immun.* 67, 1201–1206.
- Dawes, C., and Macpherson, L.M.D. (1992). Effects of Nine Different Chewing-Gums and Lozenges on Salivary Flow Rate and pH. *Caries Res.* 26, 176–182.
- Decker, E.-M., Klein, C., Schwindt, D., and von Ohle, C. (2014). Metabolic activity of *Streptococcus mutans* biofilms and gene expression during exposure to xylitol and sucrose. *Int. J. Oral Sci.* 6, 195–204.
- Dodds, M., Roland, S., Edgar, M., and Thornhill, M. (2015). Saliva A review of its role in maintaining oral health and preventing dental disease. *BDJ Team* 2, 11–13.
- Douglass, J.M., Li, Y., and Tinanoff, N. (2008). Association of mutans streptococci between caregivers and their children. *Pediatr. Dent.* 30, 375–387.
- Durán-Contreras, G.L., Torre-Martínez, H.H., de la Rosa, E.I., Hernández, R.M., and de la Garza Ramos, M. (2011). *spaP* gene of *Streptococcus mutans* in dental plaque and its relationship with early childhood caries. *Eur. J. Paediatr. Dent.* 12, 220–224.
- Esberg, A., Sheng, N., Mårell, L., Claesson, R., Persson, K., Borén, T., and Strömberg, N. (2017). *Streptococcus Mutans* Adhesin Biotypes that Match and Predict Individual Caries Development. *EBioMedicine* 24, 205–215.
- Fan, C.C., Wang, W.H., Xu, T., and Zheng, S.G. (2019). Risk factors of early childhood caries (ECC) among children in Beijing - a prospective cohort study. *BMC Oral Health* 19, 34.

- Featherstone, J.D.B. (2004). The continuum of dental caries--evidence for a dynamic disease process. *J. Dent. Res.* 83 *Spec No C*, C39-42.
- Fejerskov, O., and Manji, F. (1990). Risk assessment in dental caries. In: Bader JD, editor. *Risk assessment in dentistry*.
- Forssten, S.D., Björklund, M., and Ouwehand, A.C. (2010). *Streptococcus mutans*, Caries and Simulation Models. *Nutrients* 2, 290–298.
- Franco e Franco, T.C.C., Amoroso, P., Marin, J.M., and de Avila, F.A. (2007). Detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in dental plaque samples from Brazilian preschool children by polymerase chain reaction. *Braz. Dent. J.* 18, 329–333.
- Gilbert, K., Joseph, R., Vo, A., Patel, T., Chaudhry, S., Nguyen, U., Trevor, A., Robinson, E., Campbell, M., McLennan, J., et al. (2014). Children with severe early childhood caries: *streptococci* genetic strains within carious and white spot lesions. *J. Oral Microbiol.* 6.
- Grobler, S.R., van Wyk, C.W., and Kotze, D. (1986). Relationship between enamel fluoride levels, degree of fluorosis and caries experience in communities with a nearly optimal and a high fluoride level in the drinking water. *Caries Res.* 20, 284–288.
- Guo, L., McLean, J.S., Lux, R., He, X., and Shi, W. (2015). The well-coordinated linkage between acidogenicity and aciduricity via insoluble glucans on the surface of *Streptococcus mutans*. *Sci. Rep.* 5, 1–11.
- Hall-Stoodley, L., Costerton, J.W., and Stoodley, P. (2004). Bacterial biofilms: from the Natural environment to infectious diseases. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 95–108.
- Hanada, N., and Kuramitsu, H.K. (1989). Isolation and characterization of the *Streptococcus mutans gtfD* gene, coding for primer-dependent soluble glucan synthesis. *Infect. Immun.* 57, 2079–2085.
- Harris, R., Nicoll, A.D., Adair, P.M., and Pine, C.M. (2004). Risk factors for dental caries in young children: a systematic review of the literature. *Community Dent. Health* 21, 71–85.
- Hata, S., Hata, H., Miyasawa-Hori, H., Kudo, A., and Mayanagi, H. (2006). Quantitative detection of *Streptococcus mutans* in the dental plaque of Japanese preschool children by real-time PCR. *Lett. Appl. Microbiol.* 42, 127–131.
- Hazlett, K.R.O., Mazurkiewicz, J.E., and Banas, J.A. (1999). Inactivation of the *gbpA* Gene of *Streptococcus mutans* Alters Structural and Functional Aspects of Plaque Biofilm Which Are Compensated by Recombination of the *gtfB* and *gtfC* Genes. *Infect. Immun.* 67, 3909–3914.
- Hirose, H., Hirose, K., Isogai, E., Miura, H., and Ueda, I. (1993). Close association between *Streptococcus sobrinus* in the saliva of young children and smooth-surface caries increment. *Caries Res.* 27, 292–297.
- Igarashi, T., Yamamoto, A., and Goto, N. (2000). PCR for detection and identification of *Streptococcus sobrinus*. *J. Med. Microbiol.* 49, 1069–1074.
- Indermitte, E. (2010). Exposure to fluorides in drinking water and dental fluorosis risk among the population of Estonia.

- Ismail, A.I. (2004). Visual and visuo-tactile detection of dental caries. *J. Dent. Res. 83 Spec No C*, C56-66.
- Jacques, N.A. (1993). The fructosyltransferase of *Streptococcus salivarius*. *New Phytol. 123*, 429–435.
- Jeevarathan, J., Deepti, A., Muthu, M.S., Prabhu, V.R., and Chamundeeswari, G.S. (2007). Effect of fluoride varnish on *Streptococcus mutans* counts in plaque of caries-free children using dentocult SM strip mutans test: A randomized controlled triple blind study. *J. Indian Soc. Pedod. Prev. Dent. 25*, 157.
- Jenkinson, H.F., and Demuth, D.R. (1997). Structure, function and immunogenicity of *streptococcal* antigen I/II polypeptides. *Mol. Microbiol. 23*, 183–190.
- Jensen, B., and Bratthall, D. (1989). A New Method for the Estimation of Mutans Streptococci in Human Saliva. *J. Dent. Res. 68*, 468–471.
- Karjalainen, S., Söderling, E., Sewón, L., Lapinleimu, H., and Simell, O. (2001). A prospective study on sucrose consumption, visible plaque and caries in children from 3 to 6 years of age. *Community Dent. Oral Epidemiol. 29*, 136–142.
- Karro, E., Indermitte, E., Saava, A., Haamer, K., and Marandi, A. (2006). Fluoride occurrence in publicly supplied drinking water in Estonia. *Environ. Geol. 50*, 389.
- Kelly, C.G., Todryk, S., Kendal, H.L., Munro, G.H., and Lehner, T. (1995). T-cell, adhesion, and B-cell epitopes of the cell surface *Streptococcus mutans* protein antigen I/II. *Infect. Immun. 63*, 3649–3658.
- Kidd, E. a. M., and Fejerskov, O. (2004). What constitutes dental caries? Histopathology of carious enamel and dentin related to the action of cariogenic biofilms. *J. Dent. Res. 83 Spec No C*, C35-38.
- Klein, M.I., Flório, F.M., Pereira, A.C., Höfling, J.F., and Gonçalves, R.B. (2004). Longitudinal Study of Transmission, Diversity, and Stability of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* Genotypes in Brazilian Nursery Children. *J. Clin. Microbiol. 42*, 4620–4626.
- Klein, M.I., DeBaz, L., Agidi, S., Lee, H., Xie, G., Lin, A.H.-M., Hamaker, B.R., Lemos, J.A., and Koo, H. (2010). Dynamics of *Streptococcus mutans* Transcriptome in Response to Starch and Sucrose during Biofilm Development. *PLoS ONE 5*, e13478.
- Krol, D.M. (2003). Dental caries, oral health, and pediatricians. *Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care 33*, 253–270.
- Krzyściak, W., Jurczak, A., Kościelniak, D., Bystrowska, B., and Skalniak, A. (2014). The virulence of *Streptococcus mutans* and the ability to form biofilms. *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis. 33*, 499–515.
- Kuramitsu, H.K. (2003). Molecular genetic analysis of the virulence of oral bacterial pathogens: an historical perspective. *Crit. Rev. Oral Biol. Med. Off. Publ. Am. Assoc. Oral Biol. 14*, 331–344.

- Lee, Y. (2013). Diagnosis and Prevention Strategies for Dental Caries. *J. Lifestyle Med.* 3, 107–109.
- Lei, L., Yang, Y., Mao, M., Li, H., Li, M., Yang, Y., Yin, J., and Hu, T. (2015). Modulation of Biofilm Exopolysaccharides by the *Streptococcus mutans* *vicX* Gene. *Front. Microbiol.* 6.
- Lemos, J.A., and Burne, R.A. (2008). A model of efficiency: Stress tolerance by *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Read. Engl.* 154, 3247–3255.
- Lemos, J., Palmer, S., Zeng, L., Wen, Z., Kajfasz, J., Freires, I., Abranches, J., and Brady, L. (2019). The Biology of *Streptococcus mutans*. *Microbiol. Spectr.* 7.
- Lewis, M., Chang, G., Horton, N.C., Kercher, M.A., Pace, H.C., Schumacher, M.A., Brennan, R.G., and Lu, P. (1996). Crystal Structure of the Lactose Operon Repressor and Its Complexes with DNA and Inducer. *Science* 271, 1247–1254.
- Li, B., Li, X., Lin, H., and Zhou, Y. (2018). Curcumin as a Promising Antibacterial Agent: Effects on Metabolism and Biofilm Formation in *S. mutans*. *BioMed Res. Int.* 2018.
- Liu, C., Niu, Y., Zhou, X., Zheng, X., Wang, S., Guo, Q., Li, Y., Li, M., Li, J., Yang, Y., et al. (2015). *Streptococcus mutans* copes with heat stress by multiple transcriptional regulons modulating virulence and energy metabolism. *Sci. Rep.* 5, 12929.
- Loesche, W.J. (1986). Role of *Streptococcus mutans* in human dental decay. *Microbiol. Rev.* 50, 353–380.
- Lukacs, J.R. (2011). Sex differences in dental caries experience: clinical evidence, complex etiology. *Clin. Oral Investig.* 15, 649–656.
- Lynch, D.J., Michalek, S.M., Zhu, M., Drake, D., Qian, F., and Banas, J.A. (2013). Cariogenicity of *Streptococcus mutans* Glucan-Binding Protein Deletion Mutants. *Oral Health Dent. Manag.* 12, 191–199.
- Marinho, V.C., Higgins, J.P., Sheiham, A., and Logan, S. (2003). Fluoride toothpastes for preventing dental caries in children and adolescents. *Cochrane Database Syst. Rev.*
- Marsh, P.D. (2005). Dental plaque: biological significance of a biofilm and community lifestyle. *J. Clin. Periodontol.* 32 Suppl 6, 7–15.
- Marsh, P.D. (2010). Microbiology of Dental Plaque Biofilms and Their Role in Oral Health and Caries. *Dent. Clin. North Am.* 54, 441–454.
- Matsui, R., and Cvitkovitch, D. (2010). Acid tolerance mechanisms utilized by *Streptococcus mutans*. *Future Microbiol.* 5, 403–417.
- Matsumi, Y., Fujita, K., Takashima, Y., Yanagida, K., Morikawa, Y., and Matsumoto-Nakano, M. (2015). Contribution of glucan-binding protein A to firm and stable biofilm formation by *Streptococcus mutans*. *Mol. Oral Microbiol.* 30, 217–226.
- Matsumoto-Nakano, M. (2018). Role of *Streptococcus mutans* surface proteins for biofilm formation. *Jpn. Dent. Sci. Rev.* 54, 22–29.

- Matsumoto-Nakano, M., Fujita, K., and Ooshima, T. (2007). Comparison of glucan-binding proteins in cariogenicity of *Streptococcus mutans*. *Oral Microbiol. Immunol.* 22, 30–35.
- Mattos-Graner, R.O., and Duncan, M.J. (2017). Two-component signal transduction systems in oral bacteria. *J. Oral Microbiol.* 9.
- Mattos-Graner, R.O., Porter, K.A., Smith, D.J., Hosogi, Y., and Duncan, M.J. (2006). Functional Analysis of Glucan Binding Protein B from *Streptococcus mutans*. *J. Bacteriol.* 188, 3813–3825.
- Mitrakul, K., Asvanund, Y., and Vongsavan, K. (2011). Prevalence of five biofilm-related oral streptococci species from plaque. *J. Clin. Pediatr. Dent.* 36, 161–166.
- Munro, C., Michalek, S.M., and Macrina, F.L. (1991). Cariogenicity of *Streptococcus mutans* V403 glucosyltransferase and fructosyltransferase mutants constructed by allelic exchange. *Infect. Immun.* 59, 2316–2323.
- Nakano, K., and Ooshima, T. (2009). Serotype classification of *Streptococcus mutans* and its detection outside the oral cavity. *Future Microbiol.* 4, 891–902.
- Oho, T., Yamashita, Y., Shimazaki, Y., Kushiya, M., and Koga, T. (2000). Simple and rapid detection of *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in human saliva by polymerase chain reaction. *Oral Microbiol. Immunol.* 15, 258–262.
- Okada, M., Soda, Y., Hayashi, F., Doi, T., Suzuki, J., Miura, K., and Kozai, K. (2005). Longitudinal study of dental caries incidence associated with *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* in pre-school children. *J. Med. Microbiol.* 54, 661–665.
- Olak, J. (2013). Dental Health in Preschool and Schoolchildren in Relation to Dental Fear and Some Fear-Related Factors, and the Outcome of a Caries Prevention Program in Offspring of Fearful Mothers.
- Olak, J., Mändar, R., Karjalainen, S., Söderling, E., and Saag, M. (2007). Dental health and oral mutans streptococci in 2–4-year-old Estonian children. *Int. J. Paediatr. Dent.* 17, 92–97.
- Olak, J., Nömmela, R., Lilleberg, M., and Murakas, R. (2019). Ülevaade 3-, 6- ja 12-aastaste laste suutervise uuringust.
- Ono, T., Hirota, K., Nemoto, K., Fernandez, E.J., Ota, F., and Fukui, K. (1994). Detection of *Streptococcus mutans* by PCR amplification of *spaP* gene. *J. Med. Microbiol.* 41, 231–235.
- Palmer, S.R., Miller, J.H., Abranches, J., Zeng, L., Lefebure, T., Richards, V.P., Lemos, J.A., Stanhope, M.J., and Burne, R.A. (2013). Phenotypic Heterogeneity of Genomically-Diverse Isolates of *Streptococcus mutans*. *PLoS ONE* 8.
- Pannu, P., Gambhir, R., and Sujana, A. (2013). Correlation between the salivary *Streptococcus mutans* levels and dental caries experience in adult population of Chandigarh, India. *Eur. J. Dent.* 7, 191–195.
- Petersen, P.E., Bourgeois, D., Ogawa, H., Estupinan-Day, S., and Ndiaye, C. (2005). The global burden of oral diseases and risks to oral health. *Bull. World Health Organ.* 83, 661–669.

- Phipps, K. (1995). Fluoride and Bone Health. *J. Public Health Dent.* 55, 53–56.
- Pieralisi, F.J.S., Maciel, S.M., Andrade, F.B. de, Garcia, J.E., and Poli-Frederico, R.C. (2013). Detection of *Streptococcus mutans* of the *spaP* gene and dental caries in mother/child pairs. *RGORevista Gaúcha Odontol. Online* 61, 205–211.
- Pitts, N.B. (2004). Are We Ready to Move from Operative to Non-Operative/Preventive Treatment of Dental Caries in Clinical Practice? *Caries Res.* 38, 294–304.
- Pitts, N.B., Zero, D.T., Marsh, P.D., Ekstrand, K., Weintraub, J.A., Ramos-Gomez, F., Tagami, J., Twetman, S., Tsakos, G., and Ismail, A. (2017). Dental caries. *Nat. Rev. Dis. Primer* 3, 17030.
- Pollick, H.F. (2013). Salt fluoridation: a review. *J. Calif. Dent. Assoc.* 41, 395–397, 400–404.
- Ravikumar, D., R, M., Ningthoujam, S., Robindro, W., R, G., and Priya V, V. (2018). Genotypic characterization of *Streptococcus mutans* in child-mother pair—A PCR based study. *J. Oral Biol. Craniofacial Res.* 8, 225–230.
- Rölla, G. (1989). Why is sucrose so cariogenic? The role of glucosyltransferase and polysaccharides. *Scand. J. Dent. Res.* 97, 115–119.
- Rozen, R., Bachrach, G., Bronshteyn, M., Gedalia, I., and Steinberg, D. (2001). The role of fructans on dental biofilm formation by *Streptococcus sobrinus*, *Streptococcus mutans*, *Streptococcus gordonii* and *Actinomyces viscosus*. *FEMS Microbiol. Lett.* 195, 205–210.
- Rozen, R., Steinberg, D., and Bachrach, G. (2004). *Streptococcus mutans* fructosyltransferase interactions with glucans. *FEMS Microbiol. Lett.* 232, 39–43.
- Saraithong, P., Pattanaporn, K., Chen, Z., Khongkhunthian, S., Laohapensang, P., Chhun, N., Pattanaporn, W., Gaw, H.Y., and Li, Y. (2015). *Streptococcus mutans* and *Streptococcus sobrinus* colonization and caries experience in 3- and 5-year-old Thai children. *Clin. Oral Investig.* 19, 1955–1964.
- Sato, S., and Kuramitsu, H.K. (1986). Isolation and characterization of a fructosyltransferase gene from *Streptococcus mutans* GS-5. *Infect. Immun.* 52, 166–170.
- Selwitz, R.H., Ismail, A.I., and Pitts, N.B. (2007). Dental caries. *The Lancet* 369, 51–59.
- Senadheera, M.D., Guggenheim, B., Spatafora, G.A., Huang, Y.-C.C., Choi, J., Hung, D.C.I., Treglown, J.S., Goodman, S.D., Ellen, R.P., and Cvitkovitch, D.G. (2005). A *VicRK* Signal Transduction System in *Streptococcus mutans* Affects *gtfBCD*, *gbpB*, and *ftf* Expression, Biofilm Formation, and Genetic Competence Development. *J. Bacteriol.* 187, 4064–4076.
- Sheiham, A., and James, W.P. (2014). A reappraisal of the quantitative relationship between sugar intake and dental caries: the need for new criteria for developing goals for sugar intake. *BMC Public Health* 14.
- Shellis, R.P., and Dibdin, G.H. (1988). Analysis of the Buffering Systems in Dental Plaque. *J. Dent. Res.* 67, 438–446.

- Shemesh, M., and Steinberg, D. (2006). In vitro binding interactions of oral bacteria with immobilized fructosyltransferase. *J. Appl. Microbiol.* *100*, 871–877.
- Shemesh, M., Tam, A., and Steinberg, D. (2007). Differential gene expression profiling of *Streptococcus mutans* cultured under biofilm and planktonic conditions. *Microbiology* *153*, 1307–1317.
- Simpson, P.J., Stanton, C., Fitzgerald, G.F., and Ross, R.P. (2002). Genomic Diversity within the Genus *Pediococcus* as Revealed by Randomly Amplified Polymorphic DNA PCR and Pulsed-Field Gel Electrophoresis. *Appl. Environ. Microbiol.* *68*, 765–771.
- de Soet, J.J., van Loveren, C., Lammens, A.J., Pavčić, M.J., Homburg, C.H., ten Cate, J.M., and de Graaff, J. (1991). Differences in cariogenicity between fresh isolates of *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. *Caries Res.* *25*, 116–122.
- Song, L., Sudhakar, P., Wang, W., Conrads, G., Brock, A., Sun, J., Wagner-Döbler, I., and Zeng, A.-P. (2012). A genome-wide study of two-component signal transduction systems in eight newly sequenced mutans streptococci strains. *BMC Genomics* *13*, 128.
- Svanberg, M. (1980). *Streptococcus mutans* in plaque after mouth-rinsing with buffers of varying pH value. *Scand. J. Dent. Res.* *88*, 76–78.
- Szatko, F., Wierzbicka, M., Dybizbanska, E., Struzycka, I., and Iwanicka-Frankowska, E. (2004). Oral health of Polish three-year-olds and mothers' oral health-related knowledge. *Community Dent. Health* *21*, 175–180.
- Štšepetova, J., Truu, J., Runnel, R., Nõmmela, R., Saag, M., Olak, J., Nõlvak, H., Preem, J.-K., Oopkaup, K., Krjutškov, K., et al. (2019). Impact of polyols on Oral microbiome of Estonian schoolchildren. *BMC Oral Health* *19*.
- Zeng, L., and Burne, R.A. (2016). Sucrose- and Fructose-Specific Effects on the Transcriptome of *Streptococcus mutans*, as Determined by RNA Sequencing. *Appl. Environ. Microbiol.* *82*, 146–156.
- Zhu, L., Kreth, J., Cross, S.E., Gimzewski, J.K., Shi, W., and Qi, F. (2006). Functional characterization of cell-wall-associated protein *WapA* in *Streptococcus mutans*. *Microbiology* *152*, 2395–2404.
- Zhuang, P.L., Yu, L.X., Liao, J.K., Zhou, Y., and Lin, H.C. (2018). Relationship between the genetic polymorphisms of *vicR* and *vicK* *Streptococcus mutans* genes and early childhood caries in two-year-old children. *BMC Oral Health* *18*, 39.
- Tabchoury, C.P.M., Sousa, M.C.K., Arthur, R.A., Mattos-Graner, R.O., Del Bel Cury, A.A., and Cury, J.A. (2008). Evaluation of genotypic diversity of *Streptococcus mutans* using distinct arbitrary primers. *J. Appl. Oral Sci.* *16*, 403–407.
- Tremblay, Y.D.N., Lo, H., Li, Y.-H., Halperin, S.A., and Lee, S.F. (2009). Expression of the *Streptococcus mutans* essential two-component regulatory system *VicRK* is pH and growth-phase dependent and controlled by the *LiaFSR* three-component regulatory system. *Microbiol. Read. Engl.* *155*, 2856–2865.

- Wade, W.G. (2013). The oral microbiome in health and disease. *Pharmacol. Res.* 69, 137–143.
- Weickert, M.J., and Adhya, S. (1992). A Family of Bacterial Regulators Homologous to Gal and Lac Repressors. *J. Biol. Chem.* 267, 15869–1587.
- World Health Organization. (1994). Fluorides and oral health: report of WHO Expert Committee on Oral Health Status and Fluoride Use. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. (1997). Dentition status and treatment needs. In: Oral health surveys: basic methods, 4th ed. Geneva: World Health Organization.
- World Health Organization. (2015). Guideline: sugars intake for adults and children. Geneva: World Health Organization.
- Wu, H.-J., Wang, A.H.-J., and Jennings, M.P. (2008). Discovery of virulence factors of pathogenic bacteria. *Curr. Opin. Chem. Biol.* 12, 93–101.
- Yamashita, Y., Bowen, W.H., Burne, R.A., and Kuramitsu, H.K. (1993). Role of the *Streptococcus mutans* *gtf* genes in caries induction in the specific-pathogen-free rat model. *Infect. Immun.* 61, 3811–3817.
- Yang, J., Deng, D., Brandt, B.W., Nazmi, K., Wu, Y., Crielaard, W., and Ligtenberg, A.J.M. (2019). Diversity of *SpaP* in genetic and salivary agglutinin mediated adherence among *Streptococcus mutans* strains. *Sci. Rep.* 9, 1–9.
- Yeung, C.A., Chong, L., and Glenny, A. (2015). Fluoridated milk for preventing dental caries. *Cochrane Database Syst. Rev.* 2015.
- Young, D.A., Nový, B.B., Zeller, G.G., Hale, R., Hart, T.C., Truelove, E.L., American Dental Association Council on Scientific Affairs, and American Dental Association Council on Scientific Affairs (2015). The American Dental Association Caries Classification System for clinical practice: a report of the American Dental Association Council on Scientific Affairs. *J. Am. Dent. Assoc.* 146, 79–86.

Kasutatud veebiaadressid:

Community Preventive Services Task Force (2014). *Dental Caries (Cavities): Community Water Fluoridation*. Kasutamise kuupäev: 24. 03 2020. a., allikas: <https://www.thecommunityguide.org/findings/dental-caries-cavities-community-water-fluoridation>

EMBL-EBI. *Gene Ontology and GO Annotations*. Kasutamise kuupäev: 02. 06 2020. a., allikas: <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/annotations?geneProductId=Q8DWF5>

EMBL-EBI. *HAMP domain*. Kasutamise kuupäev: 25. 03 2020. a., allikas Classification of protein families: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/entry/InterPro/IPR003660/>

Juniordentist.com. *Types of caries causative organisms*. Kasutamise kuupäev: 18. 05 2020. a., allikas: <https://www.juniordentist.com/types-of-caries-causative-organisms.html>

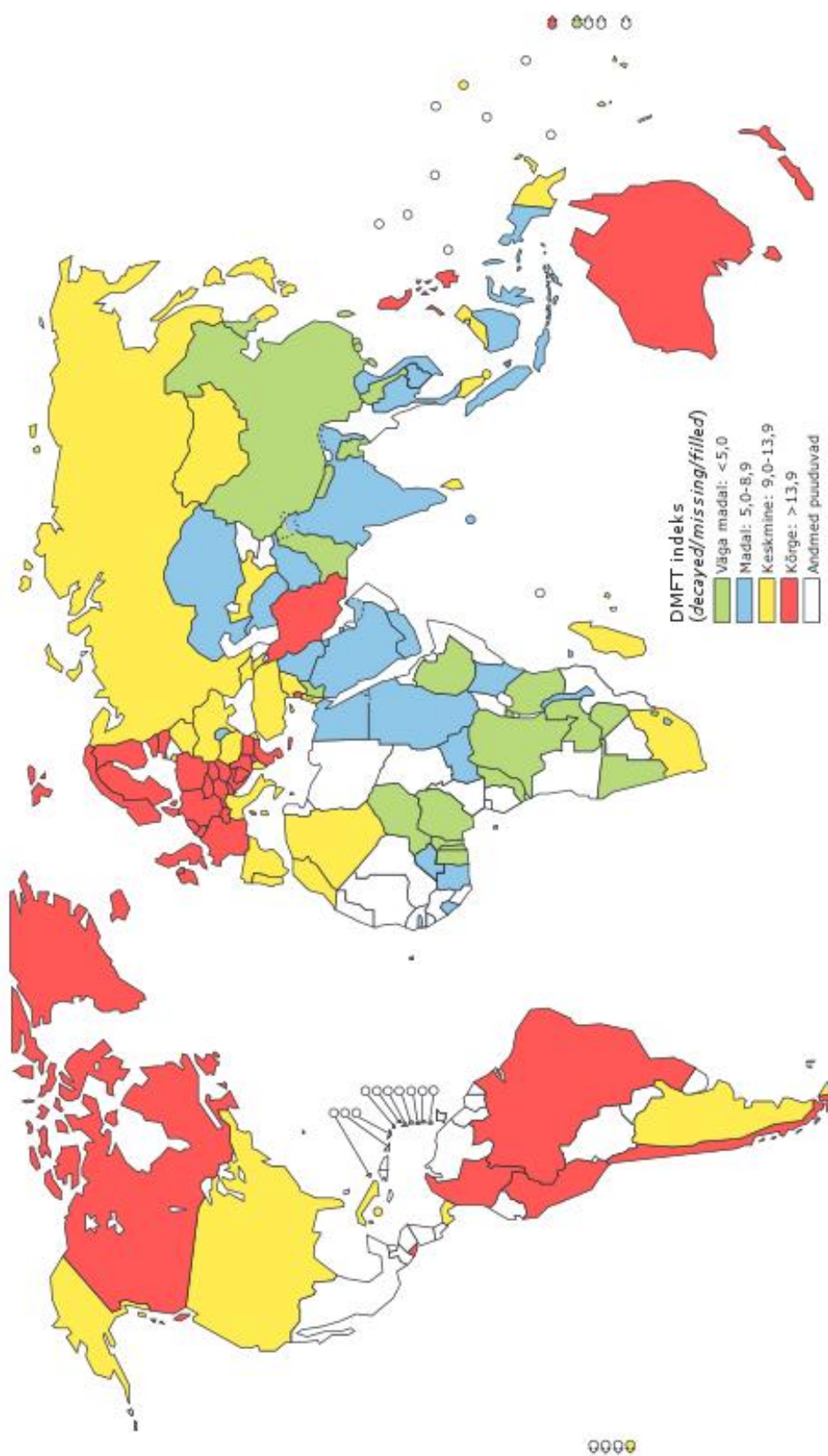
NCBI. (27. 02 2020. a.). *Tooth decay: Overview*. Kasutamise kuupäev: 09. 05 2020. a., allikas National Center for Biotechnology: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK279514/>

Orion Diagnostica. Dentocult® SM Strip mutans. Kasutamise kuupäev: 12. 05 2020. a., allikas: <http://www.laboratorveseli.cz/dokumenty/Dentocult.pdf>

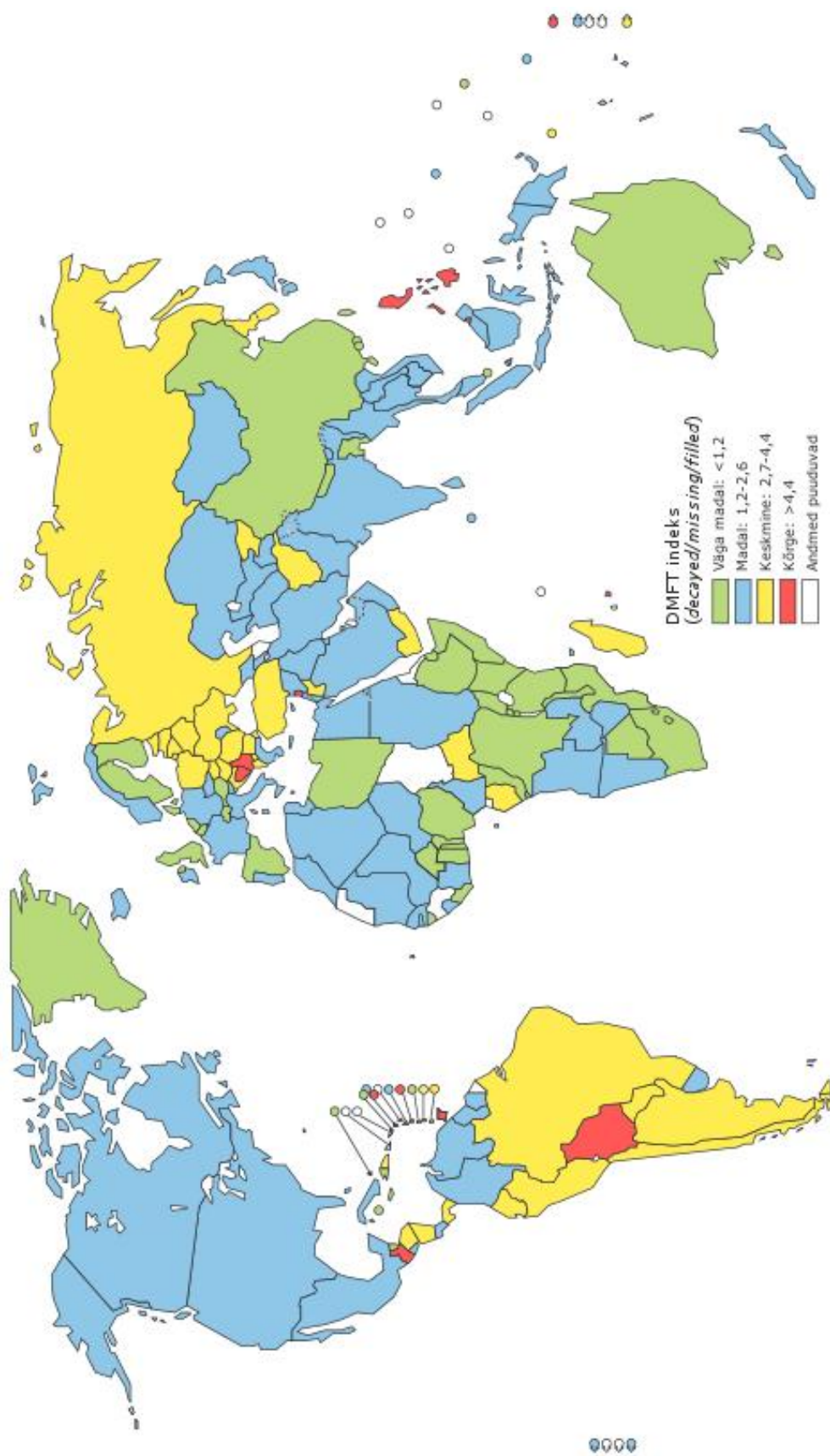
QIAGEN. (06 2011. a.). *Purification of REPLI-g amplified DNA using the QIAamp® DNA Mini Kit*. Kasutamise kuupäev: 05. 06 2020. a., allikas <https://www.qiagen.com/us/resources/resourcedetail?id=e44b5f75-9084-493d-9524-4c2840556ab8&lang=en>

LISA 1. Hambakaariese levik maailmas **(A)** 35–44 aastate seas DMFT indeksi järgi (detsember 2004 seisuga) (Petersen *et al.*, 2005). **(B)** 12 aastaste seas DMFT indeksi järgi (detsember 2004 seisuga) (Petersen *et al.*, 2005).

A.



B.

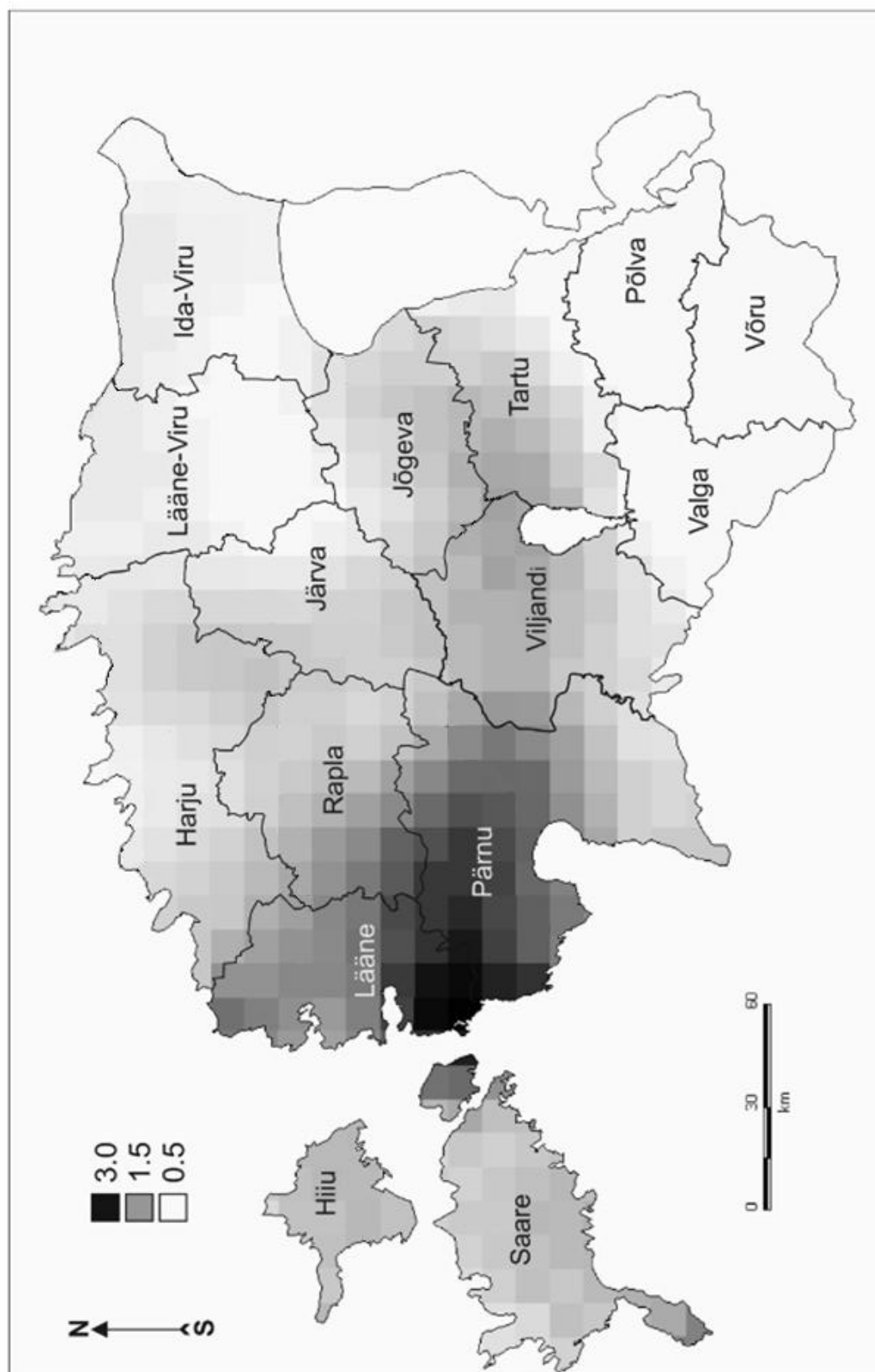


LISA 2. (A) Fluoriidi sisaldus Eesti maakondade joogivees. (B) Vee fluoriidi kontsentratsioon Eesti lõikes (modifitseeritud Indermitte, 2010 järgi). Andmed on kogutud aastal 2004 ja esitatud Ene Indermitte doktoritöös (Indermitte, 2010).

A.

		Min	Max	Mean	SD
Harju	119	0.01	2.06	0.72	0.39
Hiiu	17	0.38	1.92	1.12	0.44
Ida-Viru	48	0.21	1.29	0.59	0.24
Jõgeva	38	0.06	3.28	0.81	0.78
Järva	49	0.05	3.12	0.82	0.71
Lääne	29	0.54	5.60	2.25	1.46
Lääne-Viru	65	0.10	1.81	0.49	0.32
Põlva	31	0.08	1.10	0.34	0.27
Pärnu	63	0.08	6.95	1.84	1.53
Rapla	42	0.12	3.68	1.25	0.97
Saare	28	0.22	5.50	1.14	1.11
Tartu	73	0.10	3.48	0.82	0.65
Valga	30	0.06	1.58	0.35	0.31
Viljandi	56	0.05	2.56	1.02	0.70
Võru	47	0.08	0.45	0.26	0.10
	735	0.01	6.95	0.88	0.90

B.



LISA 3. Töös uuritud mutans-streptokokkide tüved

HUMB number	Liigi nimi	Tüve number	Asukoht	Külma pandud	Säilitustüüp
13000	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 48	249:33	9.02.2015	porous beads
13001	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 51-2	249:34	9.02.2015	porous beads
13002	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 59-2	249:35	9.02.2015	porous beads
13003	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 66	249:36	9.02.2015	porous beads
13004	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 77-3	249:37	9.02.2015	porous beads
13005	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 100	249:38	9.02.2015	porous beads
13006	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 105-2	249:39	9.02.2015	porous beads
13007	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 109	249:40	9.02.2015	porous beads
13008	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 111-2	249:41	9.02.2015	porous beads
13009	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 172-2	249:42	9.02.2015	porous beads
13011	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 187-1	249:44	9.02.2015	porous beads
13012	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 187-2	249:45	9.02.2015	porous beads
13013	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 197	249:46	9.02.2015	porous beads
13014	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 199-2	249:47	9.02.2015	porous beads
13015	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 200-2	249:48	9.02.2015	porous beads
13016	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 202-2	249:49	9.02.2015	porous beads
13017	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 206	249:50	9.02.2015	porous beads
13018	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 209	249:51	9.02.2015	porous beads
13019	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 215-2	249:52	9.02.2015	porous beads
13020	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 302-2	249:53	9.02.2015	porous beads
13025	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 324-3	249:58	9.02.2015	porous beads
13026	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 326-3	249:59	9.02.2015	porous beads
13027	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 327-2	249:60	9.02.2015	porous beads
13028	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 331	249:61	9.02.2015	porous beads
13029	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 332-2	249:62	9.02.2015	porous beads
13030	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 333-2	249:63	9.02.2015	porous beads
13031	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 335-1	249:64	9.02.2015	porous beads
13032	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 335-2	249:65	9.02.2015	porous beads
13033	<i>Streptococcus mutans</i>	JO 336-2	249:66	9.02.2015	porous beads
13038	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 345-1	249:71	9.02.2015	porous beads
13039	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 345-2	249:72	9.02.2015	porous beads
13070	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 92	258:22	19.02.2015	porous beads
13073	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 97	258:25	19.02.2015	porous beads
13079	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 104	258:31	19.02.2015	porous beads
13087	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 167-2	258:39	19.02.2015	porous beads
13093	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 196-2	258:45	19.02.2015	porous beads
13097	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 225-2	258:49	19.02.2015	porous beads
13103	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 325-2	258:55	19.02.2015	porous beads
13104	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 328	258:56	19.02.2015	porous beads
13105	<i>Streptococcus sobrinus</i>	JO 341	258:57	19.02.2015	porous beads

Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja üldsusele kättesaadavaks tegemiseks

Mina, Greete Maasi,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) minu loodud teose

Mutans-streptokokkide virulentsusfaktorid,

mille juhendajad on Reet Mändar, Jelena Štšepetova ning Merike Jõesaar,

reprodutseerimiseks eesmärgiga seda säilitada, sealhulgas lisada digitaalarhiivi DSpace kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.

2. Annan Tartu Ülikoolile loa teha punktis 1 nimetatud teos üldsusele kättesaadavaks Tartu Ülikooli veebikeskkonna, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace kaudu Creative Commons'i litsentsiga CC BY NC ND 3.0, mis lubab autorile viidates teost reprodutseerida, levitada ja üldsusele suunata ning keelab luua tuletatud teost ja kasutada teost ärieesmärgil, kuni autoriõiguse kehtivuse lõppemiseni.
3. Olen teadlik, et punktides 1 ja 2 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.
4. Kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei riku ma teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse õigusaktidest tulenevaid õigusi.

Greete Maasi

11.06.2020